



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

TESIS DOCTORAL

Implicaciones de la composición bioquímica y la condición energética de la centolla, *Maja brachydactyla* (Balss, 1922), en su ciclo reproductivo.

Patricia Verísimo Amor

2015

Director:

D. Luís Fernández Rodríguez

Doctorado en Biología Marina y Acuicultura
Departamento de Biología Celular y Molecular

*Al hombre aventurero y a la mujer creativa,
mis fuentes de inspiración.*

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis cierra una etapa intensa de mi vida donde he disfrutado de numerosas vivencias ligadas al mar, tanto en lo profesional como en lo personal. Es el fruto del esfuerzo de un gran equipo de gente que todos estos años me ha aportado conocimientos y apoyo para que este trabajo llegara a buen “puerto”.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Luis, la oportunidad que me dio hace dieciséis años de acceder al mundo de la investigación marina. Gracias por haberme transmitido pacientemente muchos de los conocimientos indispensables para mi labor investigadora y por tú confianza, a pesar de lo largo de esta aventura, de que yo terminaría la tesis en algún momento. En este tiempo he aprendido que con constancia y esfuerzo se llega a la meta aunque a veces esa meta parezca inalcanzable o imposible.

A mis padres y a mi hermana, por su apoyo incondicional y por enseñarme a no rendirme sin luchar. Os quiero con locura.

Y al resto de mi gran familia, a los Verísimo y a los Amor, por estar ahí siempre, para lo bueno y para lo malo....sois fuente de inspiración porque todos sois luchadores en esta gran aventura llamada vida.

A los investigadores de la Universidad de La Coruña, Eduardo González-Gurriarán, Ramón Muiño y Juan Freire, por haber compartido conmigo su experiencia en diferentes proyectos en los que he podido participar en estos años.

A los socios fundadores de ese “experimento” llamado Fismare S.L. Experimento que me dio la oportunidad de participar durante cinco intensos años en multitud de proyectos de diversa índole, de descubrir la dureza del mundo empresarial y del “emprendimiento”, y sobre todo, me sirvió para crecer como persona y me aportó una visión del mundo de la investigación desde un punto de vista muy diferente.

A Juan Otero, patrón del “Bolvina” con el que surcaría todos los mares, quién me enseñó a respetar y a amar el MAR. Por su paciencia en las interminables jornadas de pesca de centolla, por compartir conmigo sus experiencias de la vida en el mar, por enseñarme que siempre se aprende algo nuevo en cada jornada de pesca, por su “buen hacer” confeccionando biquinis de red y sobre todo, por su cariño y por su amistad.

A mis amigos biólogos, Alicia, Mery, Bea, Vivi, Sirka, Cris y Antonio con los que me embarcaría en cualquier aventura investigadora por loca que parezca, gritando ¡juelito!!!, ¡juelito!!! sin cesar. Sin vosotros esta tesis no habría sido posible, sois uno de los pilares fundamentales para que esto se convirtiera en lo que es a día de hoy. Gracias por compartir vuestra vida conmigo.

A Nuria, aquella chica de la Estación Biológica de A Graña con la que empecé haciendo trueque de liófilos en la época “Prestige” y con la que acabé teniendo una buena amistad. Gracias por motivarme y apoyarme en los momentos más complicados y por siempre ver mi lado bueno.

A mi equipo de reservas marinas, Ana y Duarte, dos todoterrenos con los que he disfrutado de jornadas de trabajo interminables pero placenteras y de los que he aprendido innumerables cuestiones vitales, como que se debe hacer para tener un buen “feeling” con un pescador.

A los numerosos compañeros con los que he compartido vivencias a lo largo de los años en el grupo de Reservas Marinas y Pesquerías, Belén, Carlos, Diana, Gemma, Giulia, Inma, Inés, María José, María Boán, Noela, Pablo, Paz, Rosana y Sara por su ayuda en los muestreos y por sus aportaciones desinteresadas a mi trabajo. A Nacho por su ayuda y su apoyo en el desarrollo de la última fase de esta tesis.

A mis “chicas cocodrilo”, Sonia y Eva, mis dos hermanas del alma, y sus chicos Deme y Diego, que siempre están ahí para lo bueno y para lo malo. Repetiría sin dudarlo cada aventura que he vivido con vosotras. Gracias por vuestro apoyo incondicional.

A la familia Godínez, a la que siempre estaré agradecida por su cariño y su apoyo en todos estos años, en la cercanía y en la distancia. Y en especial, a Enrique, mi hermano mayor, que me enseñó que la vida hay que vivirla “ahorita” y que no solo hay blanco o negro sino toda una gama de colores. Siempre nos quedarán los cafés en Parla querido cuate.

A mis amigos, otro de mis pilares, esas personitas que adoro con las que he compartido y compartiré las risas de los momentos felices y las lágrimas de los momentos tristes. A Roberto, “mi técnico preferido”, a Angélica, que consiguió que fuera “fotogénica”, a Ray, a Virginia y Lucho, a Guiomar, a Ibonne, a Miguel y a Pedro. A los miembros de la peña María Pita: Ana S., Anita, Carmen, Gloria, Isa, María, Marta, Nonia, Paula, Silvia y a mis chicarrones del Norte, Agus, Manu, Óscar, Rubén, Santi, Victor. Y especial a Anita que me ha hecho sonreír con la pequeña Inés en los momentos más duros, a Carmen, por compartir conmigo sus cafés no hubiera sobrevivido, a Gloria que siempre tiene palabras de ánimo para darme y a Isa que siempre me da buenos consejos.

A los Churrasquiños, Eva y Deme, Cris y Edu, Diego y Silvia, Ángel y Mariana, sin olvidar a los nuevos retoños Veva y Teo. Que haría yo sin esas interminables jornadas gastronómicas de adoración al “porco” con las que he disfrutado de muchas alegrías.

A Ana y Óscar, a Marta y David, a Maica y Dani, a Marta y Emilio, Pedro y Rosi por siempre estar ahí apoyándome, y a Juanjo por ayudarme “ciegamente” en los muestreos y en los momentos donde todo parecía ir al revés.

A los Santiagueses de la Petaquita, Belén y Luis, Fernando, Alba e Uxío por la buena acogida que le disteis cuando llego aquella chica de la coru y por aquel inolvidable viaje para conocer la vida cotidiana de la “mama” de una familia napolitana. Vivan los atardeceres en Capri!!!

Y por último, a Blecas, ese ser tranquilo y paciente que “equilibra” siempre mi locura con una gran sonrisa.

Este trabajo se realizó en el marco de los proyectos de investigación:

“Estudio de la calidad de las puestas y fecundidad de la centolla *Maja squinado*: influencia en el mantenimiento de sus poblaciones” (XUGA1030597) financiado por la Dirección General de Universidades e Investigación, Consellería de Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia.

“Dinámica metapoblacional y pesquerías de invertebrados costeros. Diseño de nuevos modelos de evaluación y gestión (DIMEPIC)” (REN2000-0446 MAR) financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT).

“Composición bioquímica y condición fisiológica en crustáceos de interés comercial: implicaciones en la reproducción (BIFICRUST)” (REN2000-0729-C02-01/MAR) financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT).

RESUMEN

Resumen

Esta tesis doctoral aborda el estudio de la biología reproductiva de *Maja brachydactyla*, centrándose en el ciclo reproductivo y el ciclo de cría a partir del análisis de las puestas y de las gónadas de las hembras, y su variabilidad en función de las condiciones ambientales. El análisis de la biología de *M. brachydactyla*, se realiza mediante una aproximación que integra aspectos morfológicos, biométricos, y bioquímicos, permitiendo obtener una imagen global sobre la inversión maternal y los requerimientos nutricionales necesarios para los procesos de maduración gonadal y de embriogénesis. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de diferencias importantes en las características de las puestas que cada hembra puede realizar en un mismo ciclo reproductivo. Estas diferencias podrían ser la consecuencia de un acoplamiento entre la condición fisiológica de las hembras, determinada por las condiciones ambientales cambiantes a lo largo de cada ciclo reproductivo, y la inversión maternal en cada puesta que da lugar a diferencias globales en el peso de la puesta y la fecundidad, así como a diferencias de calidad en términos de las características biométricas y bioquímicas de los embriones.

Resumo

Esta tese doutoral aborda o estudo da bioloxía reprodutiva de *Maja brachydactyla*, centrándose no ciclo reprodutivo e o ciclo de cría a partir da análise das postas e das gónadas das femias, e a súa variabilidade en función das condicións ambientais. A análise da bioloxía de *M. brachydactyla* realízase mediante unha aproximación que integra aspectos morfolóxicos, biométricos e bioquímicos, permitindo obter unha imaxe global sobre a inversión maternal e os requirimentos nutricionais necesarios para os procesos de maduración gonadal e de embrioxenia. Os resultados obtidos demostran a existencia de diferenzas importantes nas características das postas que cada femia pode realizar nun mesmo ciclo reprodutivo. Estas diferenzas poderían ser a consecuencia dun axuste entre a condición fisiolóxica das femias, determinada polas condicións ambientais cambiantes ó longo de cada ciclo reprodutivo, e a inversión maternal en cada posta que da lugar a diferenzas globais no peso da posta e a fecundidade, así como a diferenzas de calidade en termos das características biométricas e bioquímicas dos embrións.

Abstract

This PhD Research Thesis addresses the study of reproductive biology of *Maja brachydactyla*, focussing on the reproductive cycle and the breeding cycle, based on the analysis of broods and female gonads, and their variability according to environmental conditions. Analysis of the biology of *M. brachydactyla* is carried out through an approach that integrates morphological, biometric and biochemical aspects, allowing to obtain a global view about the maternal investment and the nutritional requirements needed for the gonadal maturation processes and for the embryogenesis. The obtained results show the existence of important differences in the characteristics of the broods that each female can carry out in the same reproductive cycle. These differences could be the consequence of an adjustment between physiological condition of the females, determined by the changing environmental conditions over each reproductive cycle, and the maternal investment in each brood that leads to global differences in brood weight and fecundity, as well as qualitative differences in terms of biometric and biochemical characteristics of the embryos.

ÍNDICE

| | |
|--|------------|
| AGRADECIMIENTOS | VII |
| RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT | IX |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| 1.1. Biología de la centolla, <i>Maja brachydactyla</i> | 3 |
| 1.1.1. Taxonomía | 3 |
| 1.1.2. Distribución geográfica y uso del hábitat | 3 |
| 1.1.3. Alimentación | 5 |
| 1.1.4. Ciclo vital y crecimiento | 5 |
| 1.1.5. Reproducción | 8 |
| 1.1.6. Importancia socioeconómica | 9 |
| 1.2. Composición bioquímica y calidad de las puestas en crustáceos | 10 |
| 1.3. Objetivos | 12 |
| 2. METODOLOGÍA GENERAL | 13 |
| 2.1. Área de estudio | 15 |
| 2.1.1. Medio natural | 15 |
| 2.1.1.1. Ría de A Coruña | 16 |
| 2.1.1.2. Ría de Arousa | 17 |
| 2.1.2. Laboratorio | 18 |
| 2.2. Métodos y estrategias de muestreo | 18 |
| 2.2.1. Medio natural | 18 |
| 2.2.1.1. Ría de A Coruña | 18 |
| 2.2.1.2. Ría de Arousa | 20 |
| 2.2.2. Laboratorio | 21 |
| 2.3. Preparación de las muestras | 21 |
| 2.3.1. Parámetros biométricos | 22 |
| 2.3.2. Recolección de muestras de huevos | 22 |
| 2.3.3. Recolección de muestras de ovarios | 25 |
| 2.4. Técnicas analíticas | 27 |
| 2.4.1. Contenido en agua | 27 |
| 2.4.2. Contenido en cenizas | 27 |
| 2.4.3. Análisis elemental | 27 |
| 2.4.4. Contenido en proteínas | 28 |
| 2.4.5. Contenido en lípidos | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.5.1. Lípidos totales | 28 |
| 2.4.5.2. Clases de lípidos | 29 |
| 2.4.5.3. Ácidos grasos | 29 |
| 2.4.6. Contenidos en carbohidratos | 30 |
| 2.4.7. Contenido en ácidos nucleicos | 31 |
| 2.4.8. Contenido en energía | 31 |
| 2.5. Análisis estadístico | 32 |
| 3. CAMBIOS DE LA FECUNDIDAD DE LA CENTOLLA, <i>M. BRACHYDACTYLA</i> (CRUSTACEA: BRACHYURA) ENTRE PUESTAS SUCESIVAS | 33 |
| 3.1. Introducción | 35 |
| 3.2. Metodología | 35 |
| 3.2.1. Muestreo | 35 |
| 3.2.2. Preparación de las muestras | 36 |
| 3.2.3. Análisis estadísticos | 37 |
| 3.3. Resultados | 37 |
| 3.3.1. Estudio de tamaño óptimo de muestra para estimación de fecundidad | 37 |
| 3.3.2. Características generales de las puestas de <i>M. brachydactyla</i> | 38 |
| 3.3.3. Variaciones de las puestas con la talla corporal de las hembras | 38 |
| 3.3.4. Variaciones interanuales en el tamaño de las puestas (1992/1998)..... | 41 |
| 3.3.5. Variaciones estacionales en el tamaño de las puestas..... | 42 |
| 3.4. Discusión | 44 |
| 3.4.1. Características generales de las puestas | 44 |
| 3.4.2. Variaciones en la puesta con la talla corporal de las hembras | 45 |
| 3.4.3. Variaciones temporales (interanuales y espaciales) en las puestas | 45 |
| 4. VARIACIONES TEMPORALES Y ESPACIALES EN LA CALIDAD DE LAS PUESTAS DE LA CENTOLLA, <i>M. BRACHYDACTYLA</i> (DECAPODA: MAJIDAE) | 47 |
| 4.1. Introducción | 49 |
| 4.2. Metodología | 51 |
| 4.2.1. Muestreo | 51 |
| 4.2.2. Preparación de las muestras | 51 |
| 4.2.3. Análisis bioquímicos | 51 |
| 4.2.4. Análisis estadísticos | 52 |
| 4.3. Resultados | 53 |
| 4.3.1. Características biométricas del embrión | 54 |
| 4.3.2. Composición básica de la puesta | 56 |
| 4.3.3. Composición bioquímica de la puesta | 61 |
| 4.3.4. Composición de clases de lípidos | 69 |
| 4.3.5. Composición de ácidos grasos | 71 |
| 4.3.5.1. Perfil de ácidos grasos | 71 |
| 4.3.5.2. Composición por grupos de ácidos grasos | 73 |
| 4.3.5.3. Composición de los principales ácidos grasos | 74 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.5.3.1. Ácidos grasos saturados | 74 |
| 4.3.5.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados | 74 |
| 4.3.5.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados | 75 |
| 4.3.6. Composición de ácidos nucleicos | 78 |
| 4.4. Discusión | 80 |
| 4.4.1. Características biométricas del embrión | 80 |
| 4.4.2. Composición básica de la puesta | 81 |
| 4.4.3. Composición bioquímica de la puesta | 81 |
| 4.4.4. Composición de clases de lípidos | 84 |
| 4.4.5. Composición de ácidos grasos | 86 |
| 4.4.5.1. Perfil de ácidos grasos | 86 |
| 4.4.5.2. Composición por grupos de ácidos grasos | 87 |
| 4.4.5.3. Composición de los principales ácidos grasos | 87 |
| 4.4.5.3.1. Ácidos grasos saturados | 87 |
| 4.4.5.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados | 88 |
| 4.4.5.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados | 88 |
| 4.4.5.3.4. Patrones generales de los principales ácidos grasos..... | 89 |
| 4.4.6. Composición de ácidos nucleicos | 90 |
| 5. CAMBIOS BIOQUÍMICOS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA CENTOLLA, <i>M. BRACHYDACTYLA</i> (DECAPODA: MAJIDAE), EN CONDICIONES EXPERIMENTALES | 91 |
| 5.1. Introducción | 93 |
| 5.2. Metodología | 95 |
| 5.2.1. Muestreo | 95 |
| 5.2.2. Experiencia de cultivo | 95 |
| 5.2.3. Análisis morfológicos y biométricos de los huevos | 96 |
| 5.2.4. Análisis bioquímicos | 96 |
| 5.2.5. Análisis estadísticos | 97 |
| 5.3. Resultados | 98 |
| 5.3.1. Determinación de estados de desarrollo embrionario | 98 |
| 5.3.2. Características biométricas del huevo a lo largo del desarrollo embrionario | 107 |
| 5.3.3. Composición básica del huevo a lo largo del desarrollo embrionario | 110 |
| 5.3.4. Composición bioquímica del huevo a lo largo del desarrollo embrionario | 113 |
| 5.3.5. Composición de ácidos grasos | 119 |
| 5.3.5.1. Perfil de ácidos grasos | 119 |
| 5.3.5.2. Composición por grupos de ácidos grasos | 119 |
| 5.3.5.3. Composición de los principales ácidos grasos | 119 |
| 5.3.5.3.1. Ácidos grasos saturados | 120 |
| 5.3.5.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados | 120 |
| 5.3.5.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados | 121 |
| 5.3.6. Composición de ácidos nucleicos | 126 |

| | |
|--|------------|
| 5.4. Discusión | 128 |
| 5.4.1. Estados de desarrollo embrionario | 128 |
| 5.4.2. Características biométricas del huevo a lo largo del desarrollo embrionario | 130 |
| 5.4.3. Composición básica del huevo a lo largo del desarrollo embrionario | 131 |
| 5.4.4. Composición bioquímica del huevo a lo largo del desarrollo embrionario | 132 |
| 5.4.5. Composición de ácidos grasos | 134 |
| 5.4.5.1. Perfil de ácidos grasos | 134 |
| 5.4.5.2. Consumo total de ácidos grasos | 134 |
| 5.4.5.3. Composición por grupos de ácidos grasos | 135 |
| 5.4.5.4. Composición de los principales ácidos grasos | 135 |
| 5.4.6. Composición de ácidos nucleicos | 137 |
| 6. VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA A LO LARGO DE LA MADURACIÓN DE LOS OVARIOS DE LA CENTOLLA <i>M. BRACHYDACTYLA</i> (DECAPODA: MAJIDAE) | 139 |
| 6.1. Introducción | 141 |
| 6.2. Metodología | 142 |
| 6.2.1. Muestreo | 142 |
| 6.2.2. Preparación de las muestras | 142 |
| 6.2.3. Análisis bioquímicos | 143 |
| 6.2.4. Análisis estadísticos | 143 |
| 6.3. Resultados | 144 |
| 6.3.1. Caracterización de los ovarios a lo largo del desarrollo gonadal | 145 |
| 6.3.1.1. Características biométricas del ovario y de los ovocitos | 145 |
| 6.3.1.2. Composición básica del ovario | 147 |
| 6.3.1.3. Composición bioquímica del ovario | 147 |
| 6.3.1.4. Composición de clases de lípidos | 149 |
| 6.3.1.5. Composición de ácidos grasos | 149 |
| 6.3.1.5.1. Perfil de ácidos grasos | 149 |
| 6.3.1.5.2. Composición por grupos de ácidos grasos | 151 |
| 6.3.1.5.3. Composición de los ácidos grasos principales | 151 |
| 6.3.1.6. Composición de ácidos nucleicos | 154 |
| 6.3.2. Variaciones entre puesta sucesivas en las características biométricas y bioquímicas del ovario en dos rías gallegas | 154 |
| 6.3.2.1. Características biométricas del ovario y de los ovocitos | 155 |
| 6.3.2.2. Composición básica del ovario | 158 |
| 6.3.2.3. Composición bioquímica del ovario | 162 |
| 6.3.2.4. Composición de clases de lípidos | 171 |
| 6.3.2.5. Composición de ácidos grasos | 176 |
| 6.3.2.5.1. Perfil de ácidos grasos | 176 |
| 6.3.2.5.2. Composición por grupos de ácidos grasos | 176 |
| 6.3.2.5.3. Composición ácidos grasos individuales | 177 |

| | |
|--|------------|
| 6.3.2.5.3.1. Ácidos grasos saturados | 177 |
| 6.3.2.5.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados | 177 |
| 6.3.2.5.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados | 178 |
| 6.3.2.5.3.4. Relaciones de ácidos grasos | 179 |
| 6.3.2.5.3.5. Grado de incremento de los ácidos grasos a lo largo de la maduración | 180 |
| 6.3.2.6. Composición de ácidos nucleicos | 185 |
| 6.4. Discusión | 188 |
| 6.4.1. Características biométricas del ovario | 188 |
| 6.4.1.1. Tamaño del ovario | 188 |
| 6.4.1.2. Tamaño de los ovocitos | 189 |
| 6.4.2. Composición básica del ovario | 190 |
| 6.4.3. Composición bioquímica del ovario | 191 |
| 6.4.4. Composición de clases de lípidos | 194 |
| 6.4.5. Composición de ácidos grasos | 196 |
| 6.4.5.1. Perfil de ácidos grasos | 196 |
| 6.4.5.2. Incremento total de ácidos grasos | 197 |
| 6.4.5.3. Composición por grupos de ácidos grasos | 198 |
| 6.4.5.4. Composición de los principales ácidos grasos | 199 |
| 6.4.5.4.1. Ácidos grasos saturados | 199 |
| 6.4.5.4.2. Ácidos grasos monoinsaturados | 200 |
| 6.4.5.4.3. Ácidos grasos poliinsaturados | 200 |
| 6.4.6. Composición de ácidos nucleicos | 202 |
| 7. CONCLUSIONES | 203 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 207 |
| 9. ANEXO | 243 |

1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. BIOLOGÍA DE LA CENTOLLA, *MAJA BRACHYDACTYLA*

1.1.1. Taxonomía

La centolla, es un crustáceo decápodo que pertenece a la superfamilia Majoidea (Ng *et al.*, 2008; De Grave *et al.*, 2009) que cuenta con más de 800 especies ampliamente distribuidas en aguas marinas (Brownell *et al.*, 1977). Esta especie fue considerada como *Maja squinado* (Herbst, 1788) hasta que Neumann (1996, 1998) identificó diferencias a nivel morfológico entre las poblaciones del Mediterráneo (*M. squinado*) y del Atlántico Nordeste (*M. brachydactyla* (BALSS, 1922)). A posteriori Sotelo *et al.* (2008), mediante estudios moleculares, corroboraron la clasificación propuesta por Neumann (1996, 1998) y justificaron la designación de esos dos taxones como diferentes especies. Para facilitar la identificación de las dos especies de manera sencilla, Guerao *et al.* (2011) desarrollaron un índice morfométrico, que relaciona la longitud del cefalotórax con la distancia entre los extremos distales de las espinas antero-orbitales, que permite diferenciar morfológicamente los adultos de *M. brachydactyla* y *M. squinado*.

1.1.2. Distribución geográfica y uso del hábitat

M. brachydactyla muestra una extensa distribución geográfica a lo largo del Atlántico Oriental, desde el sur del Mar del Norte hasta Senegal, incluyendo las islas de Madeira, Azores, Canarias y Cabo Verde y la zona del estrecho de Gibraltar (Clark, 1986; Hines *et al.*, 1995; Neumann, 1998; Udekem d' Acoz, 1999; Sotelo *et al.*, 2009; Abelló *et al.*, 2014; Fig. 1.1).

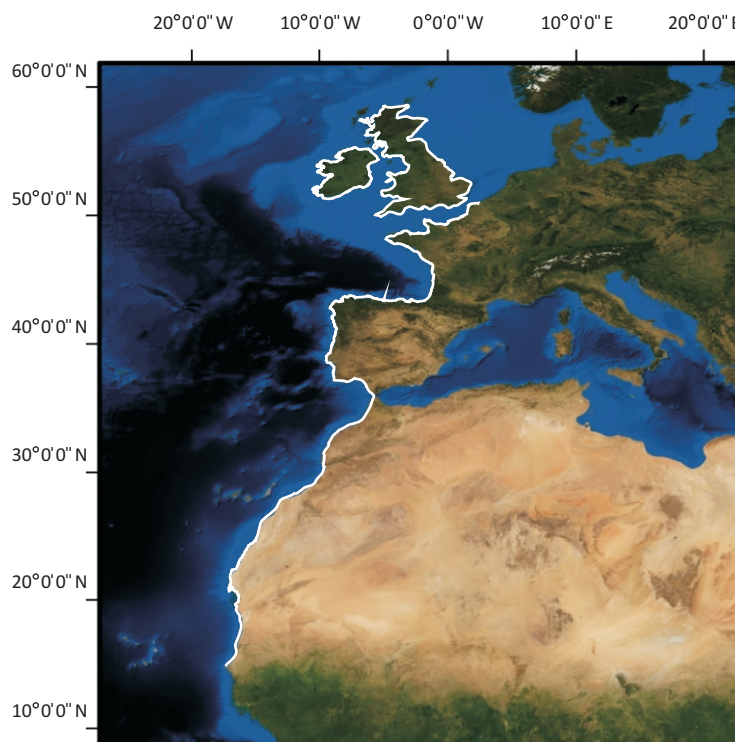


Fig. 1.1. Distribución geográfica de *M. brachydactyla* (Udekem d' Acoz, 1999; Sotelo *et al.*, 2009)

Este gradiente latitudinal, que comprende desde el 60°N hasta 30°S, está marcado por el rango de temperatura (7 a 20 °C) y salinidad (33 a 36 ‰) óptimos para la supervivencia de la especie (ICES, 1993). Así, el límite superior de su distribución presenta un mínimo de temperaturas de 5°C en invierno y 15°C en verano, ya que temperaturas inferiores a 4-5°C son letales para la reproducción y el desove de las hembras de esta especie (ICES, 1993). La existencia de este amplio rango climático en su distribución va a provocar que se observen cambios en los parámetros de su historia de vida, diferenciándose las poblaciones de zonas templadas (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1995, 1998; ICES, 1993; Freire *et al.*, 1999; García-Flórez & Fernández-Rueda, 2000; Sampedro *et al.*, 2003) de las de zonas frías (Carlisle, 1957; Hartnoll, 1965; Edwards, 1979; Brosnan, 1981; Rodhouse, 1984; Le Foll, 1993; Meyer, 1993; Fahy, 2001).

El hábitat en el que viven los individuos de *M. brachydactyla* varía según la época/estación del año, mostrando evidencias de una segregación espacial según el sexo, el estado de madurez (juveniles y adultos) y el estado reproductivo (Kergariou, 1971, 1984; Edwards, 1980; Kergariou & Veron, 1981; Rodhouse, 1984; Le Foll, 1993; Meyer, 1993; González-Gurriarán & Freire, 1994).

Los principales factores que permiten caracterizar esta segregación son la profundidad y el tipo de sustrato. Así, se pueden encontrar juveniles sobre diferentes tipos de sustratos: rocosos (Kergariou, 1971; Kergariou & Veron, 1981; González-Gurriarán & Freire, 1994), arenosos (Kergariou, 1971; Kergariou & Veron, 1981; Meyer, 1992; Le Foll, 1993; Sampedro *et al.*, 2003) y mixtos (Brosnan, 1981; Rodhouse, 1984; Sampedro *et al.*, 1999; Sampedro & González-Gurriarán, 2004) de zonas someras (<20 m). Mientras que, los adultos muestran un rango de distribución más amplio, que varía según la época del año a consecuencia de la migración reproductiva (Bell, 1853; Bourdon, 1965; Kergariou 1971, 1976, 1984; Edwards 1977, 1979, 1980). De esta forma, durante la primavera y el verano, se pueden encontrar adultos en zonas someras (<20 m), sobre diferentes tipos de fondos (Kergariou, 1971, 1976, 1984, Kergariou & Veron, 1981); y posteriormente debido a la migración, en zonas de aguas más profundas, entre 30-100 m (en ocasiones hasta 120 m; Kergariou, 1984) con fondos de sustrato blando (Kergariou, 1971; Edwards, 1980; Camus, 1983; Latrouite & Le Foll, 1989; González-Gurriarán *et al.*, 2002; Corgos *et al.*, 2006), donde permanecen durante el otoño y el invierno.

Los movimientos de los juveniles son limitados, no direccionales y a pequeña escala, con desplazamientos de menos de 10 m al día (Hines *et al.*, 1995; Freire & González-Gurriarán, 1998; González-Gurriarán *et al.*, 2002; Bernárdez *et al.*, 2003). En el golfo Ártabro, cuando los juveniles alcanzan su primer año de vida, con un tamaño de 70-80 LC, realizan desplazamientos desde zonas de sustrato rocoso muy someras (aproximadamente 5 m) donde se ha producido el asentamiento postlarvario, a zonas de roca o arena de mayor profundidad (5-15 m), donde pasan su segundo año de vida (Corgos *et al.*, 2011).

El patrón de uso del hábitat (sustrato, profundidad y grado de exposición al oleaje) muestra la preferencia de los juveniles por áreas protegidas con características oceánicas (Corgos *et al.*, 2011). Dentro de estas áreas protegidas, en las zonas menos expuestas los juveniles tienen preferencia por los sustratos rocosos (por ejemplo en la ría de Arousa, González-Gurriarán & Freire, 1994), mientras que en las zonas más expuestas, prefieren grandes zonas de arena donde formar agregaciones para protegerse del elevado hidrodinamismo (por ejemplo en la ría de A Coruña, Corgos *et al.*, 2011 o en el Golfo Normano-Bretón, Le Foll, 1993; Meyer, 1993). El empleo de isótopos estables ha demostrado la existencia de movimientos frecuentes de los juveniles entre hábitats, especialmente durante el periodo nocturno (Freire *et al.*, 2009). Los juveniles de *M. brachydactyla* permanecen la mayor parte del tiempo en hábitats de arena, que constituyen hábitats refugio donde pueden formar agregaciones y enterrarse para disminuir el riesgo de predación y el estrés físico provocado por el hidrodinamismo (oleaje,

corrientes, etc) respecto a los hábitats rocosos, donde los juveniles de mayor tamaño tienen un menor número de refugios disponibles. Además, presentan un marcado comportamiento mimético, con una gran cobertura de organismos sobre su caparazón, fundamentalmente algas, para camuflarse y evitar a los predadores (Parapar *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 1998).

1.1.3. Alimentación

Los estudios de la composición de la dieta de *M. brachydactyla* realizados mediante observaciones directas en el campo (Carlisle, 1957; Kergariou, 1974), experimentos de laboratorio (Brosnan, 1981) y estudios basados en el contenido del estómago (Kergariou, 1974; Brosnan, 1981; Bernárdez *et al.*, 2000) han sugerido que la centolla tiene una dieta omnívora, compuesta principalmente de macroalgas (Laminariaceae) e invertebrados bentónicos sésiles (*Mytilus* sp., ascidias solitarias) o con cierta movilidad (*Acanthochitona crinitus*, *Bittium* sp., *Aslia lefevrei*). Las variaciones en la dieta vienen determinadas por la abundancia estacional de presas y por su disponibilidad, en función de sus características anatómicas y comportamentales, principalmente la movilidad y la presencia de estructuras externas duras (Bernárdez *et al.*, 2000).

Por otro lado, Freire *et al.* (2009) determinaron mediante análisis de isótopos estables que la alimentación de los juveniles se lleva a cabo principalmente en hábitats rocosos donde obtienen dos tercios del alimento de su dieta, a pesar de que el alimento ingerido en hábitats arenosos tiene un mayor valor energético. Probablemente este comportamiento sea debido a que los hábitats rocosos son zonas de mayor abundancia de alimento y con más refugios contra los predadores.

1.1.4. Ciclo vital y crecimiento

El ciclo vital de *M. brachydactyla* se puede dividir en tres fases principales: la fase larvaria, la fase juvenil o de crecimiento y la fase adulta o reproductiva.

La **fase larvaria** es planctónica y está compuesta por dos estados de zoea (zoea I y II) y un estado de megalopa (Fig. 1.2) (Lebour, 1927; Clark, 1986; Ingle, 1992; Guerao *et al.*, 2008). La duración total del desarrollo larvario varía entre 18 y 23 días desde el momento de la eclosión del huevo hasta el asentamiento del primer estadio postlarvario o juvenil (Schlegel, 1911a y b; Lebour, 1927, 1928; Iglesias *et al.*, 2002; Andrés *et al.*, 2007, 2008; Guerao *et al.*, 2008; Palma *et al.*, 2008) dependiendo de la temperatura del agua, cuyo incremento reduce el tiempo de desarrollo (Kergariou, 1971; Ingle, 1980; Martin & Planque, 2006). En experiencias de cultivo larvario realizadas a dos temperaturas (15°C y 18°C), se ha observado una duración promedio de la zoea I de 5-6 días de desarrollo, de la zoea II de 6-7 días de desarrollo y de la megalopa de 7-10 días de desarrollo (Guerao *et al.*, 2010).

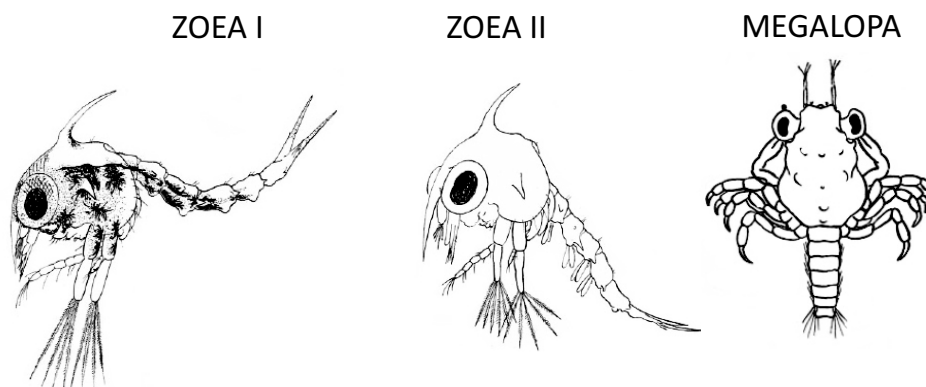


Fig. 1.2. Las fases del desarrollo larvario: Zoea I, Zoea II y Megalopa.

El reclutamiento postlarvario en Galicia tiene lugar probablemente desde finales de primavera hasta el otoño (Corgos, 2004) y marca el inicio de la fase juvenil o de crecimiento. En esta fase, los juveniles llevan a cabo su crecimiento mediante mudas sucesivas que siguen un patrón variable en función de la talla, siendo menor el número de mudas cuanto mayor es la talla del juvenil (González-Gurriarán *et al.*, 1995). Durante el proceso de muda, los ejemplares suelen permanecer inmóviles y refugiados hasta que se endurece el caparazón y en ocasiones forman agrupaciones de individuos denominadas por los pescadores gallegos “tellones”, que pueden llegar a estar formados por cientos o miles de individuos (Sampedro & González-Gurriarán, 2004).

En el Golfo Ártabro los juveniles menores de 85 mm de longitud de caparazón (LC) realizan mudas sucesivas durante todo el año, mientras que los de mayor tamaño presentan un patrón de muda estacional con dos picos, uno en primavera y otro al inicio del otoño, con una clara distinción entre sexos, siendo más importante el pico de primavera para las hembras y el de otoño para los machos (Corgos *et al.*, 2007). Además, los juveniles de mayor tamaño presentan un crecimiento medio por muda del 32.4% (± 4.7 dt) con respecto a la talla preecdisial, oscilando entre el 22.9% y el 45.7%, y similar en ambos sexos tanto en mudas prepubertales como en mudas terminales (Corgos *et al.* 2007).

En el cultivo de laboratorio de las primeras fases de juvenil (2.1 a 15.6 mm de LC) se ha observado un rango de incremento entre 27.9% y 37.0% en cada muda (Guerao & Rotllant, 2010). Mientras que, en juveniles mayores de 60 mm de LC se obtuvieron incrementos por muda desde el 18.2% al 45.2% en cultivos de laboratorio y del 15.6% al 41.5% en cultivos extensivos (González-Gurriarán *et al.*, 1995; Sampedro, 2001).

Durante la fase juvenil se produce la maduración gonadal de los machos, distinguiéndose dentro de los juveniles dos grupos: los inmaduros (más pequeños y sin espermatóforos) y los adolescentes (con espermatóforos). En el caso de las hembras, la maduración gonadal no comienza hasta dos o tres meses después de la muda terminal, durante el periodo previo o durante la migración reproductiva (Corgos & Freire, 2006).

El final de la fase juvenil (individuos adolescentes) viene determinada por la aparición de la muda terminal (Kergariou, 1984; Latrouite & Le Foll, 1989; Le Foll, 1993; González-Gurriarán *et al.*, 1995; Sampedro *et al.*, 1999; Freire *et al.* 2002; Corgos, 2004; Corgos & Freire, 2006; Corgos *et al.*, 2007). La época del año en la que se produce el cambio de juvenil a adulto difiere entre zonas geográficas, así en las costas gallegas ocurre durante el verano (julio-septiembre) del segundo o tercer año de vida (dependiendo de la época de reclutamiento) (González-Gurriarán *et al.*, 1995; Freire *et al.*, 1999; Sampedro *et al.*, 2003), mientras que en el Golfo Normano-Bretón se retrasa al otoño (Le Foll, 1993; Meyer, 1993).

El rango de tallas en el cual los individuos alcanzan la muda terminal varía en función de las condiciones ambientales a las que se han visto sometidos durante la fase de juvenil y del momento del año en el que son reclutados. Así, en Galicia la talla de madurez de las hembras varía entre 114-143 mm de longitud de caparazón, con una talla media de madurez estimada similar en las dos rías estudiadas (130.4 mm en la ría de Arousa (Sampedro *et al.*, 1999) y 130.3 mm en el Golfo Ártabro (Corgos & Freire, 2006). En cambio en los machos el rango es más amplio, oscilando entre 112-165 mm, con una talla media de madurez estimada de 132.7 mm en la ría de Arousa (Sampedro *et al.*, 1999) y 136.5 mm en el Golfo Ártabro (Corgos & Freire, 2006).

En el Golfo Ártabro, la estacionalidad de la muda terminal presenta diferencias entre sexos. Así, los machos realizan la muda terminal entre abril y septiembre (con un pico máximo en julio), mientras que

las hembras la llevan a cabo en un periodo de tiempo más corto, de junio a septiembre (con un pico máximo en agosto) (Corgos *et al.*, 2006).

Tras la muda terminal, los individuos alcanzan la madurez sexual y pasan a la fase adulta o reproductiva. En las hembras se producen cambios en la morfología del abdomen, pasándose de un abdomen plano sin pleópodos desarrollados (juveniles, Fig. 1.3) a un abdomen más ancho y abombado, con espacio disponible para la incubación de las puestas, y pleópodos completamente desarrollados (Fig. 1.4). Mientras que, en los machos se producen un cambio en el tamaño relativo de los quelípedos con respecto al cuerpo (Teissier, 1933, 1935; Hartnoll, 1963; Sampedro *et al.*, 1999; Corgos & Freire, 2006; Fig. 1.4).

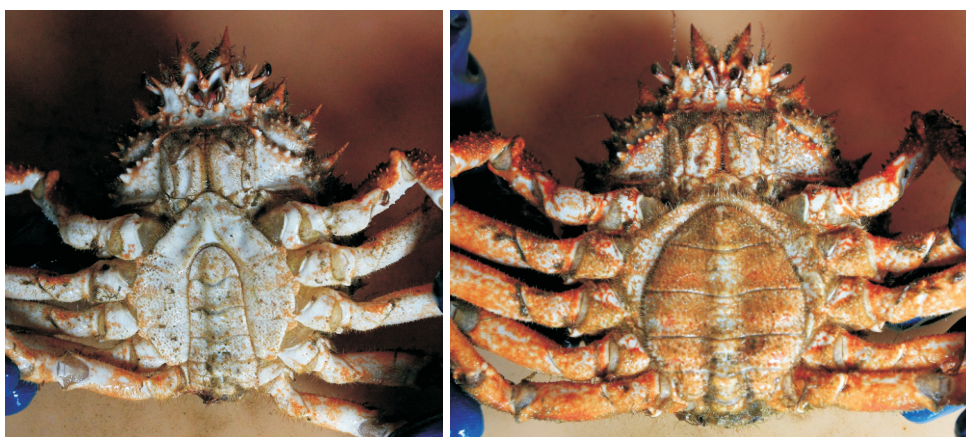


Fig. 1.3. Caracteres morfológicos de juveniles de *M. brachydactyla*, con vista ventral del macho (izquierda) y de la hembra (derecha).



Fig. 1.4. Caracteres morfológicos de los adultos de *M. brachydactyla*, con vista dorsal (arriba) y ventral (abajo)

1.1.5. Reproducción

Entre finales de verano y principios de otoño, los adultos postpubertales realizan una migración reproductiva desde zonas someras hacia zonas más profundas con fondos de sustrato blando (Kergariou, 1976, 1984; Edwards, 1980; Camus, 1983; Latrouite & Le Foll, 1989; González-Gurriarán & Freire, 1994; Hines *et al.*, 1995; González-Gurriarán *et al.*, 2002; Corgos & Freire, 2006). Esta migración supone un cambio dramático de actividad, con desplazamientos rápidos de más de 1-10 km en pocos días, tras un periodo juvenil con movimientos exclusivamente a pequeña escala (cientos de metros) (González-Gurriarán & Freire, 1994; Hines *et al.*, 1995; González-Gurriarán *et al.*, 2002).

Se han observado diferencias en la temporalidad de la migración entre machos y hembras. Así, en el Golfo Ártabro se ha constatado que los machos no tienen un pico definido de migración, desplazándose desde septiembre a octubre a zonas más profundas, mientras que las hembras presentan un pico definido en octubre (Corgos *et al.*, 2006). Además, González-Gurriarán *et al.* (2002) estimaron una duración media de la migración de las hembras de 5.7 días en la ría de Arousa. Este comportamiento migratorio puede estar relacionado con las estrategias reproductivas de ambos sexos. En el caso de los machos se ha observado que esta migración está relacionada con fenómenos de competencia en el apareamiento con las hembras (Corgos *et al.*, 2006).

La migración reproductiva coincide con el comienzo de la maduración de las gónadas y el desarrollo de los receptáculos seminales o espermatecas en las hembras (estructuras de almacenamiento de esperma), lo cual indica el inicio del ciclo reproductivo (González-Gurriarán *et al.*, 1998). En el Golfo Ártabro, las hembras presentan las gónadas en estados de desarrollo tempranos entre julio y octubre. Durante este periodo el 93% de las hembras están en estado I, y hasta noviembre no se observan estados de desarrollo gonadal más avanzados. Esto indica que la maduración gonadal comienza entre dos y tres meses después de la muda terminal, en el periodo previo o durante la migración a aguas profundas (Corgos & Freire, 2006). Este patrón de maduración gonadal es similar al observado por González-Gurriarán *et al.* (1993) en la ría de Arousa y por García-Flórez & Fernández-Rueda (2000) en las costas de Asturias.

El proceso de apareamiento tiene lugar generalmente en los hábitats de aguas profundas (González-Gurriarán *et al.*, 1998; Corgos *et al.*, 2006), fundamentalmente cuando la hembra presenta las gónadas en avanzado estado de madurez (Hartnoll, 1969; Brosnan, 1981; González-Gurriarán *et al.*, 1996, 1998).

En dicho proceso el macho se coloca con la parte ventral de su cuerpo hacia arriba y la hembra se posiciona enfrente con la parte ventral hacia el macho (Hartnoll, 1969; Brosnan, 1981; González-Gurriarán *et al.*, 1998). Tras el apareamiento, se produce una migración de retorno de las hembras hacia aguas someras para la incubación de la primera puesta del ciclo reproductivo anual (Kergariou, 1971; González-Gurriarán *et al.*, 1993; Le Foll, 1993). En cuanto a los machos, las observaciones de los pescadores indican que no participan en la migración de regreso a aguas someras, permaneciendo en los hábitats de aguas profundas de la especie (Corgos, 2004).

La fecundación es interna y tiene lugar simultáneamente a la extrusión de los huevos a la cavidad abdominal, quedando posteriormente adheridos a los pleópodos o apéndices abdominales de la hembra hasta su eclosión (Diesel, 1991). A lo largo del rango de distribución de *Maja brachydactyla* (Hartnoll, 1963; Kergariou, 1971, 1975, 1984) se ha constatado que la fecundidad es mayor que en otras especies de la superfamilia Majoidea como *Hyas coarctatus* e *Inachus dorsettensis* (Bryant & Hartnoll, 1995), *Libidoclaea granaria* (Schejter & Spivak, 2005), *Stenocionops ovata* (Villalejo-Fuerte *et al.*, 1999).

con valores de hasta 400.000 huevos por puesta (Kergariou, 1971, 1984; Anónimo, 1993). En cuanto al tamaño de los huevos, las especies de la familia Majidae presenta huevos de gran tamaño en comparación con otras especies de braquiuros (Hines, 1982, 1986; Bryant & Hartnoll, 1995).

El período de incubación de la puesta oscila entre 30 y 77 días, dependiendo de la temperatura del agua (Lang, 1973; Kergariou, 1975, 1984; Brosnan, 1981; Rodhouse, 1984; González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998; García-Flórez & Fernández-Rueda, 2000; Iglesias *et al.*, 2002). Durante este periodo, las hembras cuidan a los embriones moviendo los pleópodos para oxigenar la masa de huevos. González-Gurriarán *et al.* (1998) observaron que la duración de la incubación en condiciones experimentales fue de 58 días para las puestas de mayo-junio y octubre-noviembre (temperatura media del agua de 15.9°C) mientras que en el periodo julio-septiembre la duración del desarrollo embrionario fue de 40 días (temperatura media del agua de 18.5°C).

A medida que avanza el periodo de incubación de los huevos se produce la maduración de las gónadas de las hembras (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998). Así, tras la eclosión de los huevos, las hembras pueden realizar la siguiente puesta en una media de 3.4 días (González-Gurriarán *et al.*, 1998). La presencia de receptáculos seminales o espermatecas en las hembras permite que puedan fecundar varias puestas consecutivas sin necesidad de realizar nuevos apareamientos, como se ha constatado en otras especies del mismo género (Beninger *et al.*, 1988; Diesel, 1989, 1991; Sainte-Marie & Lovrich, 1994; Elner & Beninger, 1995; Sainte-Marie & Carrière, 1995; González-Gurriarán *et al.*, 1996, 1998). En condiciones experimentales, el esperma almacenado en las espermatecas, frecuentemente entre una y tres masas de espermatóforos, puede llegar a fecundar de cuatro a cinco puestas durante un mismo ciclo reproductivo (González-Gurriarán *et al.*, 1993).

El periodo reproductivo de *M. brachydactyla* en Galicia abarca principalmente los meses de diciembre a noviembre, y se estima que cada hembra puede llegar a incubar tres puestas anuales (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998). Este periodo reproductivo, similar al encontrado en Asturias por García-Flórez & Fernández-Rueda (2000), presenta pequeñas variaciones con otras áreas de distribución de la especie, siendo en el oeste de Irlanda de marzo a septiembre (Brosnan, 1981; Rodhouse, 1984) y en el Canal de la Mancha (Francia) de febrero a octubre (Kergariou, 1975). El número de puestas anuales también varía entre las diferentes zonas geográficas. Así, en la costa oeste de Irlanda (Brosnan, 1981; Rodhouse, 1984; Fahy, 2001), en la isla de Mann (Hartnoll, 1965) y en la costa sureste de Inglaterra (Carlisle, 1957; Edwards, 1979) esta especie presenta una única puesta anual, mientras que en la costa francesa, se producen dos puestas, la primera en febrero-mayo, y la segunda en junio-agosto (Martin, 1983; Kergariou, 1984).

1.1.6. Importancia socioeconómica

En torno a la centolla, *M. brachydactyla*, se desarrolla una importante actividad socio-económica, especialmente intensa en España y en distintos puntos del Atlántico Nordeste, como Inglaterra, Irlanda, Francia, Canal de la Mancha, Portugal y Marruecos (Le Foll, 1993). Galicia, con unas 300 embarcaciones dedicadas a su pesca durante 6 meses al año, representa con creces la principal zona de explotación en España, tanto a nivel de producción (73%) como económica (más del 80% de los ingresos). En el año 2014, se capturaron 241.000 kg de esta especie en las costas gallegas, lo que supusieron unos ingresos de 2775107 euros (Fuente: www.pescadegalicia.com). La presión de las capturas sobre las poblaciones naturales es muy fuerte, y se estima que más del 90% de los adultos recién maduros son capturados anualmente con pesca legal e ilegal, lo que puede indicar problemas de sobreexplotación de la especie (Freire *et al.*, 2002).

1.2. COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA Y CALIDAD DE LAS PUESTAS EN CRUSTÁCEOS

El conocimiento de los procesos metabólicos y bioquímicos de los crustáceos no solo permite mejorar el entendimiento de los aspectos biológicos más relevantes, como son la reproducción y el crecimiento, sino que también ayuda a establecer medidas orientadas a la conservación de las poblaciones, sobre todo de especies sometidas a explotación comercial. Las variaciones de la composición bioquímica de los tejidos a lo largo de las distintas fases del crecimiento y de la reproducción reflejan el estado fisiológico individual, así como la influencia de distintos factores ambientales, como el hábitat, la época del año o la alimentación sobre el desarrollo de ambos procesos.

En invertebrados marinos, la inversión maternal es el principal factor que determina la estructura y dinámica poblacional (Marshall & Keough, 2008; Hammerschmidt *et al.*, 2011). Dado que el desarrollo embrionario en crustáceos decápodos es completamente lecitotrófico (Anger, 2001), la calidad y cantidad de reservas embrionarias que proporciona la hembra dependen de su estado fisiológico y son críticas para el desarrollo, eclosión y supervivencia temprana de las larvas (Giménez, 2006). Los recursos disponibles para el embrión son proporcionados por las hembras a partir de la dieta maternal previa a la ovogénesis (Racotta *et al.*, 2003), por lo que la maduración gonadal en crustáceos decápodos está estrechamente asociada al balance energético entre los costes del metabolismo somático interno y del metabolismo relacionado con la inversión reproductiva.

La fecundidad de una especie y su variabilidad (entre individuos y según las condiciones ambientales) nos informa de la inversión maternal en el proceso reproductivo. El conocimiento de la producción de huevos, en términos de número y tamaño, es esencial para estimar el potencial reproductivo y su impacto sobre el futuro tamaño de las poblaciones, proporcionando elementos básicos para el entendimiento de las estrategias reproductivas, la dinámica espacio-temporal y la evolución poblacional (Ramírez-Llodra, 2002; Cobo & Okamori, 2008).

Los cambios bioquímicos que ocurren durante la embriogénesis tienen relación con los requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo del embrión. Aunque las proteínas son el principal componente de los huevos de invertebrados marinos (Holland, 1978), los lípidos juegan un papel crucial en el metabolismo embrionario, ya que representan la fuente principal de energía, constituyendo al menos el 60% de la energía total gastada durante el desarrollo embrionario en crustáceos (Herring, 1974; Holland, 1978; Amsler & George, 1984; Wehrtmann & Graeve, 1998), además de ser empleados como componentes estructurales de las membranas celulares (Rosa & Nunes, 2003a). Asimismo, la presencia de ácidos grasos esenciales y su dinámica a lo largo del desarrollo embrionario es fundamental para el éxito del proceso reproductivo (Anger, 1998).

Por otro lado, las larvas plantotróficas pueden depender de las reservas energéticas de origen embrionario en caso de no encontrar alimento inmediatamente disponible (Anger, 2001; Rotllant *et al.*, 2001). En este sentido, la calidad y cantidad de los nutrientes que permanecen tras el desarrollo embrionario tendrán un gran impacto sobre el desarrollo y la supervivencia larvaria y, en última instancia, sobre la dinámica de la población (Pochelon, 2011).

Otro de los procesos importantes del ciclo reproductivo es la vitelogénesis. En *Maja brachydactyla* la formación del vitelo sigue el mismo patrón descrito para otras especies de crustáceos decápodos (Kessel, 1968; Hinsch & Cone, 1969; Eurenus, 1973; Dhainaut & De Leersnyder, 1976; Zerbib, 1979). La vitelogénesis comienza con una fase endógena, un proceso continuo de síntesis de vitelo en el que participan estructuras citoplasmáticas como la mitocondria y el complejo de Golgi. Este proceso finaliza

con una fase exógena, en la cual una serie de compuestos (principalmente lipoproteínas) son incorporados en el ooplasma por micropinocitosis (Rotllant *et al.*, 2007).

Debido a la importancia de estos procesos, se han realizado numerosos estudios de los cambios bioquímicos en gónadas, huevos, hepatopáncreas y músculo durante los procesos de maduración, muda y reproducción de crustáceos decápodos (Gehring, 1974; Read & Caulton, 1980; Du Preez & Mclachlan, 1983; Galois, 1984; Wheaton & Lawson, 1985; Castille & Lawrence, 1989; Chandumpai *et al.*, 1991; Cavalli *et al.*, 2000; Cifuentes & Quiñinao, 2000; Gököolu & Yerlikaya, 2003; Hasek & Felder, 2005, 2006; Barrento *et al.*, 2009a) y también numerosas experiencias de cultivo sobre la influencia de la alimentación en la composición bioquímica de los tejidos de crustáceos decápodos, sobre todo en especies con gran importancia en la acuicultura (Cahu *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 1999; Manivannan *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011; Sui *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Portella *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2013; Huo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015; Harhoglu *et al.*, 2015).

En particular, en *M. brachydactyla* existen diversos trabajos sobre su biología reproductiva tanto a nivel fisiológico (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1996, 1998) como bioquímico y energético (Andrés *et al.*, 2007, 2008, 2010a y b; Figueiredo & Narciso, 2008; Andrés, 2010; Marques *et al.*, 2010; Rotllant *et al.*, 2013a y b). Así, Figueiredo & Narciso (2008) determinaron la composición de ácidos grasos esenciales de los huevos de centolla en diferentes momentos de su desarrollo embrionario, observando que la composición cualitativa de ácidos grasos es similar a la de otras especies de crustáceos decápodos (Wehrtmann & Kattner, 1998; Narciso & Morais, 2001; Rosa *et al.*, 2007). Por otra parte, Andrés *et al.* (2007, 2008, 2010a y b) realizaron estudios en laboratorio sobre la composición bioquímica de las larvas a lo largo del desarrollo y sobre la composición bioquímica de larvas recién eclosionadas en diferentes épocas del año, apreciando que las larvas de final de año presentan un relativo incremento de lípidos y proteínas en su composición, lo cual podría indicar una cierta adaptación de las larvas a las condiciones adversas de temperatura y disponibilidad de alimento existentes en la época invernal. Asimismo, Rotllant *et al.* (2013a) analizaron las variaciones de la composición bioquímica de las larvas recién eclosionadas del medio natural en un periodo de cinco años (2005-2010), encontrándose una alta variabilidad en la composición bioquímica de las larvas con diferencias interanuales debidas principalmente a la contribución de los triglicéridos y, en menor medida, al contenido de lípidos y proteínas.

No obstante, todavía hay aspectos importantes de la biología de esta especie que son desconocidos desde el punto de vista bioquímico, tales como el estudio de la calidad de las puestas y su variabilidad a lo largo del ciclo reproductivo, o la composición bioquímica de los tejidos implicados en la reproducción y la condición fisiológica individual de las hembras.

El conocimiento detallado de estos aspectos ayudará a establecer medidas de gestión orientadas al mantenimiento y conservación de las poblaciones y stocks, así como a la mejora de la explotación de este recurso sometido a una gran presión pesquera.

1.3. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es profundizar en el conocimiento de diferentes aspectos de la biología reproductiva de la centolla, *M. brachydactyla*, (ciclo de cría, ciclo reproductivo, fecundidad, potencial reproductivo, desarrollo embrionario) desde una perspectiva bioquímica, así como describir la influencia del ambiente a nivel espacial y temporal.

Los objetivos concretos, algunos de los cuales son de especial relevancia por su potencial aplicabilidad en la gestión pesquera de este recurso, son los siguientes:

1. Describir la variabilidad en el esfuerzo reproductivo, en términos de fecundidad y peso de la puesta, y las características biométricas individuales de los huevos que la conforman, entre diferentes periodos de puesta dentro del mismo ciclo reproductivo, y entre distintos ciclos reproductivos.
2. Caracterizar la calidad de las puestas de *M. brachydactyla* en base a aspectos biométricos y bioquímicos. Estudiar su variabilidad espacial y temporal, analizando la influencia de las condiciones ambientales que caracterizan los diferentes periodos de puesta de un ciclo reproductivo, así como la variabilidad entre distintos ciclos reproductivos.
3. Estudiar los principales cambios que caracterizan el desarrollo embrionario de *M. brachydactyla*, integrando aspectos morfológicos, biométricos y bioquímicos, y analizar su variabilidad en función de las condiciones ambientales.
4. Caracterizar la composición bioquímica de las gónadas de *M. brachydactyla* y analizar los cambios que se producen en el proceso de maduración gonadal a lo largo del ciclo reproductivo en función de diferentes condiciones ambientales.

El primer capítulo de esta tesis está basado en el artículo: Verísimo, P., Bernárdez, C., González-Gurriarán, E., Freire, J., Muiño, R., and Fernández, L. (2011). Changes between consecutive broods in the fecundity of the spider crab, *Maja brachydactyla*. ICES Journal of Marine Science, 68: 472–478.

2

METODOLOGÍA GENERAL

2.1. ÁREA DE ESTUDIO

2.1.1. Medio natural

La costa de Galicia (NW de la Península Ibérica), se caracteriza por la existencia de una plataforma estrecha de entre 25 y 65 km. Presenta una morfología muy sinuosa, con una extensión de 1195 km, donde destacan una serie de formaciones de tipo estuárico denominadas rías, cuyas características topográficas, oceanográficas y climáticas, les confieren la capacidad de albergar sistemas marinos con una alta producción biológica. Su importancia radica en que está situada en el extremo norte del sistema de afloramiento del Atlántico Noreste (Wooster *et al.*, 1976), presentando afloramientos principalmente durante la primavera y el verano (Fraga, 1981; Bode *et al.*, 2002; Gómez-Gesteira *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2008a, 2010; Fontan *et al.*, 2008; Gómez-Gesteira, 2010), aunque también se pueden observar en otoño y en invierno (Santos *et al.*, 2001; Gómez-Gesteira *et al.*, 2006; De Castro *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2009; Gómez-Gesteira, 2010).

Los afloramientos introducen en el interior de las rías agua subsuperficial, agua central del Atlántico Noroccidental (ENACW), más fría y rica en nutrientes (Fiuza, 1984; Alvarez *et al.*, 2008b). La ENACW genera una alta producción primaria que es, en buena parte, responsable de la elevada pesca y producción acuícola que caracteriza a esta región (Tenore *et al.*, 1995). Además en invierno pueden producirse eventos de afloramiento asociados a la corriente ibérica hacia el polo (IPC), caracterizada por ser una masa de agua cálida y salina cuya ocurrencia e intensidad varía entre años (Frouin *et al.*, 1990; Haynes & Barton, 1990). Esta corriente incrementa la salinidad y reduce el contenido en nutrientes de los estuarios situados a lo largo de la costa gallega (Prego *et al.*, 2007).

Las rías gallegas en función de su situación geográfica se clasifican en Rías Altas, Rías Medias y Rías Bajas. Este trabajo se han realizado en dos áreas de estudio: la ría de A Coruña, y la ría de Arousa, situadas en la costa de Galicia dentro de las denominadas Rías Altas y Rías Bajas gallegas, respectivamente (Fig. 2.1).

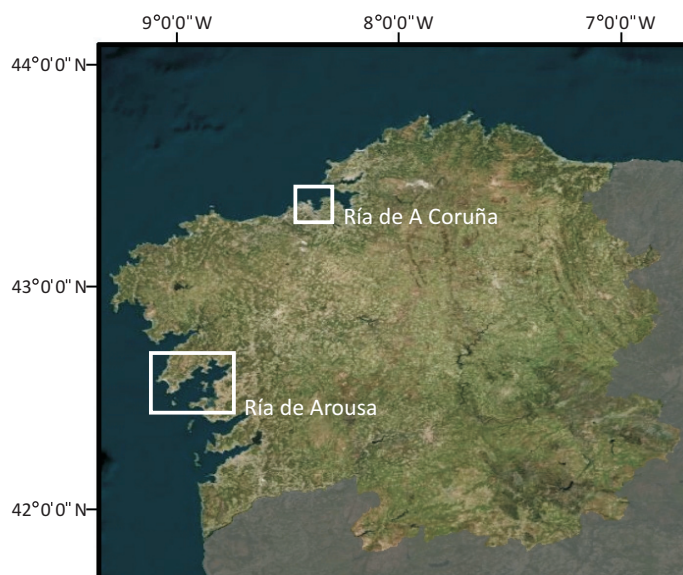


Fig. 2.1. Localización geográfica de las dos zonas de estudio, ría de A Coruña y ría de Arousa, en la costa gallega.

2.1.1.1. Ría de A Coruña

Dentro de las Rías Altas, la ría de A Coruña (Fig. 2.2), ubicada entre 43°20' y 43°23' de latitud N, y entre 8°19' y 8°23' de longitud W, se encuadra, junto con las rías de Ferrol y Ares-Betanzos, en las denominadas rías del Golfo Ártabro (Cosme de Avilés & Prego, 1995). Presenta orientación N-S en su eje principal, con una longitud de 5 km y una anchura máxima en su boca de 3 km, abarca un área total de 15.7 km² y un volumen de 215.3·10⁶ m³. Posee una profundidad media de 25 m en la parte externa y 10 m en la interna; esta última incluye una amplia área portuaria en la margen izquierda que está dragada a 14 m (Cabanas, 1987; Varela *et al.*, 1994; Cosme De Avilés & Prego, 1995). La ría de A Coruña recibe aportes fluviales fundamentalmente del río Mero, que desemboca en la cabecera de la ría (Ríos Barja & Rodríguez Lestegas, 1992).

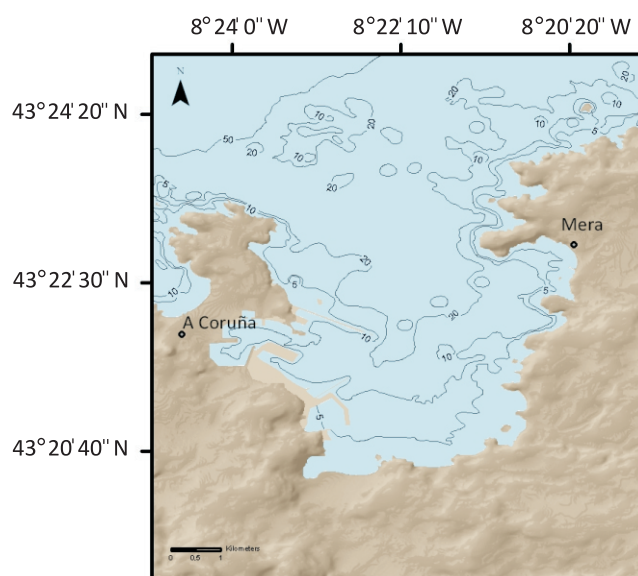


Fig.2.2.Detalle de la ría de A Coruña y sus costas adyacentes.

Dentro de la ría de A Coruña se distinguen dos zonas con diferentes características oceanográficas; la parte interna con características estuáricas y la parte externa con influencia oceánica (Cabanas, 1987; Montero *et al.*, 1997). La salinidad superficial, en la parte externa es poco variable (35.4-35.6‰) mientras que en la zona interna se producen oscilaciones estacionales, alcanzándose valores de 30‰ en invierno y 35.5‰ en verano. La salinidad no sufre oscilaciones en profundidad (más de 10-15 metros), manteniéndose constante entorno al 35.5‰ en toda la ría. En cuanto a la temperatura en superficie, presenta un rango de variación estacional entre 12 y 17°C mientras que en profundidad se sitúa entre 12.7 a 15°C con procesos de inversión térmica en la época invernal.

Las condiciones oceanográficas de esta ría están determinadas por un lado, por la ascensión en primavera y verano de una masa de agua oceánica situada en el área externa de la ría y en profundidad por el empuje de otras masas de agua presentes en la plataforma adyacente (González, 1975; Cabanas, 1987). Por otro lado, los aportes fluviales del Río Mero influyen sobre la capa de agua superficial de la zona interna de la ría, especialmente en invierno y primavera, detectándose incluso aguas superficiales con características continentales en la plataforma continental próxima a la ría (Bode & Varela, 1998). La descarga media anual de agua dulce en esta ría es de 7.4 m³s⁻¹, con valores máximos de 21 m³s⁻¹ en febrero y mínimos de 1 m³s⁻¹ en septiembre (valores medios para el período 1970-1982; Varela *et al.*, 1994).

Aunque las características geomorfológicas y tectónicas de la ría de A Coruña le confieren la denominación de ría (Torre Enciso, 1954), a nivel oceanográfico constituye una bahía con alta influencia oceánica (Varela *et al.*, 1994; Cosme De Avilés & Prego, 1995).

2.1.1.2. Ría de Arousa

La ría de Arousa ($42^{\circ}44' - 42^{\circ}68' \text{ N}$ y $9^{\circ}05' - 8.77^{\circ} \text{ W}$), ubicada dentro de las Rías Bajas, es la mayor de las rías gallegas (Fig. 2.3). Presenta una longitud de 33 km y una anchura máxima en la parte más externa de 10.3 km con orientación SW-NE, abarcando una superficie total de 230 km^2 y un volumen de $4.5 \cdot 10^9 \text{ m}^3$ (Rosón *et al.*, 1995). Tiene una profundidad media de 19 m, alcanzando hasta los 70 m en el canal central de la ría. En la entrada de la ría se encuentra la Isla de Sálvora, que divide la boca de la ría en dos; la parte norte con 3.5 km de anchura y una profundidad de 10 m, que abarca desde la isla de Sálvora hasta Aguiño, y la parte sur, que se extiende desde la isla de Sálvora hasta la península de O Grove, con una mayor anchura (4.5 km) y profundidades que sobrepasan los 60 m (Rosón *et al.*, 1995). La boca sur constituye la zona de intercambio de agua oceánica con el canal principal de la ría, el cual discurre hacia el oeste de la Isla de Arousa, permitiendo la entrada de aguas profundas hacia la zona interna de la ría. Hacia la costa noroccidental de la ría, este canal está delimitado por una serie de islas e islotes que conforman un cordón casi continuo a lo largo de la ría.

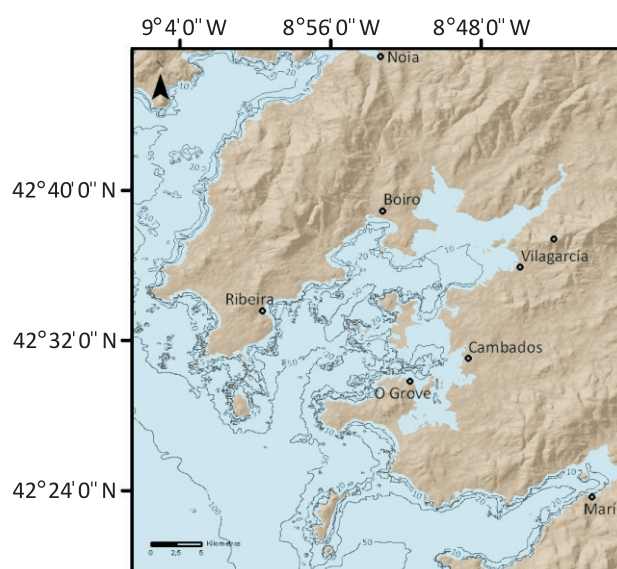


Fig.2.3. Detalle de la ría de Arousa y sus costas adyacentes.

En la ría de Arousa los principales aportes fluviales proceden de los ríos Ulla y Umia. El río Ulla, con un caudal medio de $60 \text{ m}^3/\text{s}$, desemboca en la parte NW de la ría, generando un estuario de 2.5 km de anchura en su parte final. El aporte de agua dulce de este río tiene importantes implicaciones en la dinámica oceanográfica, influyendo en el régimen de corrientes existentes en la parte más interna de la ría. Por otro lado, el río Umia, con un caudal medio de $14 \text{ m}^3/\text{s}$, desemboca en el margen SW de la ría, frente a la Isla de la Toja. Los caudales de estos ríos sufren variaciones estacionales e interanuales, alcanzándose máximos en invierno, con $70\text{-}140 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ y mínimos en verano, con $5\text{-}75 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (Otto, 1975; Tenore *et al.*, 1982; Rosón *et al.*, 1991, 1995).

En función de las características oceanográficas existentes en la ría de Arousa se pueden distinguir tres áreas a lo largo de su eje longitudinal: el área más externa, con régimen oceánico y limitada por la línea Este que une la Isla de Arousa y Ribeira, la zona central de la ría, situada entre ésta línea y la que dibuja Punta de Chazo (Boiro) al norte y la Isla de Arousa al sur, que constituye un área de transición entre las características oceánicas del exterior y las estuáricas del área interna, y el área interna, con características estuáricas e influenciada por los aportes fluviales del río Ulla (Fig. 2.3).

La distribución termohalina dentro de esta ría está influenciada por el patrón general de circulación existente. Los valores de salinidad mínimos (3.5‰) se alcanzan en la zona más interna de la ría, sobretudo en la orilla norte, y a partir de ahí se produce un gradiente de salinidad ascendente hasta alcanzar los valores máximos (35.6‰) en las zonas profundas del área más externa de la ría. Por otro lado, a lo largo de la ría la temperatura superficial sufre variaciones estacionales, ascendiendo en verano entre 15 y 18°C, formándose una termoclina que desaparece durante los procesos de afloramiento, y descendiendo en invierno a valores entorno a los 12.5-13.5°C. Sin embargo, la temperatura en profundidad se mantiene constante entre 11 y 13°C a lo largo del año. Las diferencias de temperatura en la época invernal entre la capa de agua superficial y la capa profunda pueden provocar procesos de inversión térmica (Gómez-Gallego, 1971, 1975; Fernández-Castillejo & Lavín, 1982; Iglesias & Nunes, 1982).

2.1.2. Laboratorio

Se realizó una experiencia en cautividad, en los laboratorios del Centre Mediterrani d'Investigacions Marines i Ambientals (CMIMA - CSIC) de Barcelona (Fig. 2.4), para caracterizar de forma detallada a nivel morfológico y biométrico los diferentes estadios de desarrollo embrionario y los cambios en su composición bioquímica a lo largo de dicho desarrollo.



Fig. 2.4. Centre Mediterrani d'Investigacions Marines i Ambientals (CMIMA - CSIC).

2.2. MÉTODOS Y ESTRATEGIAS DE MUESTREO

2.2.1. Medio natural

2.2.1.1. Ría de A Coruña

Los muestreos se llevaron a cabo en dos ciclos anuales de cría de *M. brachydactyla* a lo largo del eje longitudinal de la ría y en la zona oceánica adyacente a bordo de una embarcación de pesca comercial de 10 metros de eslora (Fig. 2.5). En el ciclo de anual de cría de 1999 se tomaron muestras en invierno (febrero-marzo), momento en el que las hembras ovígeras se encuentran realizando la primera puesta, y en primavera (mayo-junio), cuando están desarrollando las puestas posteriores (segunda y tercera puesta). Mientras que, en el ciclo de cría de 2002 las muestras se recogieron mensualmente desde diciembre de 2002 a octubre de 2004. El arte empleada para la captura de los ejemplares de *M. brachydactyla*, es un tipo de nasa experimental similar a la nasa utilizada en la pesca comercial de la faneca (*Trisopterus luscus*), y de gran eficacia en la captura de centolla. Esta “nasa fanequeira” consiste en un armazón de hierro galvanizado de 10 milímetros de sección y 50 centímetros de altura, y está compuesto de un aro inferior de 100 centímetros de diámetro, un aro superior de 110 centímetros de diámetro y una entrada lateral de 22 centímetros de diámetro, recubierto por una malla de 50

milímetros de luz (Fig. 2.6). En el interior de cada nasa se sitúa una pequeña bolsa de malla (50 milímetros de luz) donde se introduce el cebo (jurel, *Trachurus trachurus*, o caballa, *Scomber scombrus*).



Fig. 2.5. Detalle de la embarcación empleada para los muestreos.

En cada muestreo se llevaron a cabo un número variable de lances (1 a 8), consistentes en un grupo de seis nasas separadas entre sí 25 metros y caladas en el mar durante un período de 24 horas aproximadamente. Se capturaron en total 221 hembras que proceden tanto de sustratos rocosos como arenosos de diferentes profundidades.

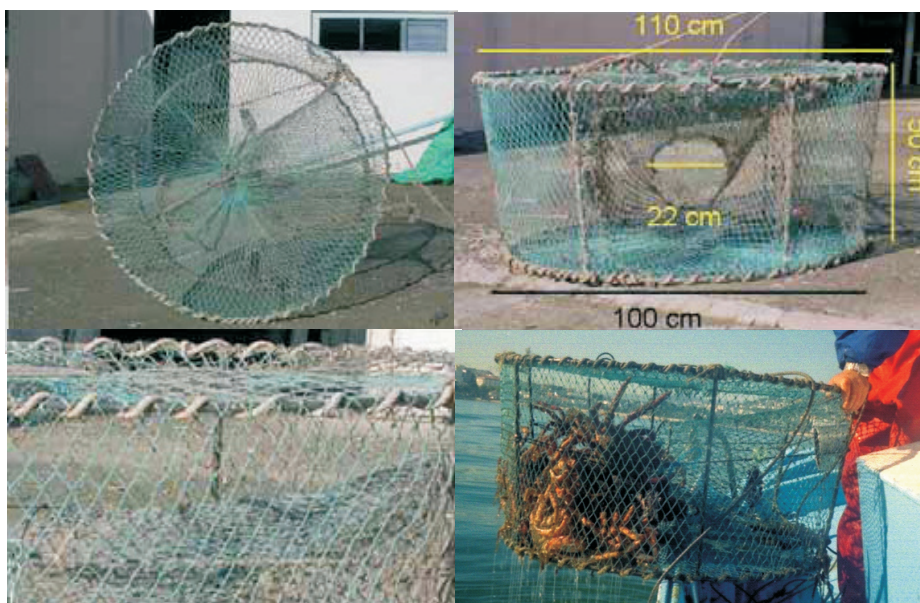


Fig. 2.6. Detalle de la nasa fanequeira empleada para la captura de centolla.

Tanto en los muestreos de la ría de A Coruña como en los de la ría de Arousa se determinó la madurez sexual de las hembras recolectadas mediante la observación de la morfología del abdomen en el momento de su captura en la embarcación de pesca artesanal. De esta manera, se aseguró la recolección de hembras adultas devolviendo al mar aquellas que todavía eran inmaduras. Asimismo, se discriminó la edad entre hembras adultas recientes y hembras adultas tardías mediante un método basado en criterios externos (cobertura por epibiontes, desgaste del caparazón, etc.) de Kergariou & Verón (1981), eligiendo solamente aquellas hembras que alcanzaron su madurez sexual recientemente y se encuentran en su primer año de adultas.

2.2.1.2. Ría de Arousa

Los muestreos se realizaron durante tres ciclos anuales de cría de *M. brachydactyla* en la zona más externa de la ría, principalmente, donde se concentra la pesquería de esta especie. En el primer ciclo de cría se tomaron muestras mensuales desde diciembre de 1991 hasta septiembre de 1992, a partir de capturas comerciales procedentes de las descargas realizadas en el puerto de O Grove (en enero de 1992 no fue posible la toma de muestras debido a las continuas condiciones climatológicas adversas). En el segundo y el tercer ciclo de cría estudiados (1998 y 1999) se realizaron muestreos a bordo de una embarcación fuera-borda de pesca comercial de 6 metros de eslora (Fig. 2.7) en invierno (marzo en 1998 y febrero y marzo en 1999), momento en el que las hembras ovígeras se encuentran realizando la primera puesta, y en primavera (junio en 1998 y mayo y junio en 1999), cuando están desarrollando las puestas posteriores (segunda y tercera puesta).



Fig. 2.7. Detalle de la embarcación empleada para los muestreos.

Todos los ejemplares obtenidos de las embarcaciones de pesca artesanal se capturaron con artes de enmalle. Estos aparejos estáticos están formados por uno (trasmallos) o varios (miños) paños de red que se disponen perpendiculares al fondo, alcanzando una altura de hasta 1.5 m aproximadamente. Con una red de sección muy fina, estos aparejos tienen una eficiencia muy elevada, siendo capaces de interceptar a los animales cuando realizan sus desplazamientos (Fig. 2.8). Se capturaron en total 188 hembras que proceden tanto de sustratos rocosos como arenosos de diferentes profundidades.

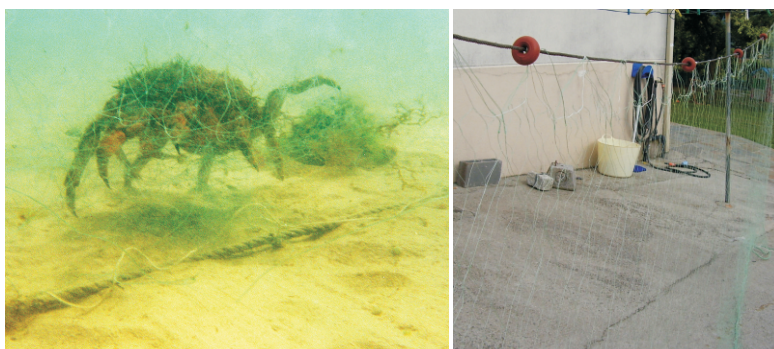


Fig. 2.8. Detalle del arte de pesca empleada para la captura de centolla.

2.2.2. Laboratorio

En Noviembre de 2002 se capturaron 15 individuos (9 hembras no ovígeras y 6 machos) de *M. brachydactyla* por medio de embarcaciones de pesca comercial a lo largo de la ría de A Coruña. A continuación, los ejemplares fueron enviados en neveras portátiles con bloques de frío y paños humedecidos en agua de mar para mantener un nivel mínimo de temperatura ($8 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad durante su traslado al centro del CMIMA en Barcelona.

Las centollas se mantuvieron en condiciones de cautividad en dos tanques de 2000 l (3 machos y 5/4 hembras por tanque) conectados a unidades de circuito abierto de agua de mar que mantienen la salinidad constante (35.5‰) y el fotoperiodo (Fig. 2.9). La temperatura osciló entre dos rangos: desde el comienzo de la experiencia hasta finales de abril, en un rango entre 12.1°C y 15°C ($13.9 \pm 0.55^\circ\text{C}$) y desde mayo hasta septiembre, con un rango entre 13.5°C y 16.9°C ($15.3 \pm 0.92^\circ\text{C}$). Estas condiciones experimentales de temperatura imitan a las condiciones ambientales del medio natural de la época invernal, donde las hembras llevan a cabo su primera puesta, y de la época de primavera-verano, donde las hembras llevan a cabo sus posteriores puestas (segunda y tercera puesta normalmente). Los individuos fueron alimentados *ad libitum* con ejemplares congelados de mejillón, *Mytilus sp.*



Fig. 2.9. Detalle de las instalaciones donde se realizó el cultivo de centollas.

Los abdómenes de las hembras de *M. brachydactyla* fueron examinados semanalmente para chequear la presencia de puestas. En marzo de 2003 se comenzó la recogida de muestras de las puestas de los ejemplares en cautividad. Cada 4 días se recogieron muestras de entre 2 y 3 gr de peso fresco de cada puesta. En algunas puestas en las que se constató un gran descenso del número de huevos (probablemente por estrés), sobre todo al final del desarrollo, la recogida paso a realizarse cada 7 días. Esta experiencia de cultivo, que comenzó el 21 de noviembre de 2002, tuvo una duración de 10 meses, lo que permitió muestrear entre 31 y 39 muestras de huevos de cada ejemplar durante el desarrollo de las sucesivas puestas.

2.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las hembras capturadas en el medio natural fueron trasladadas al laboratorio en neveras portátiles a baja temperatura y con paños humedecidos en agua de mar. De esta forma, se mantiene un nivel mínimo de temperatura y humedad que ralentiza el metabolismo de los individuos y permite el intercambio gaseoso-respiratorio, manteniéndose las branquias en condiciones de humedad adecuadas, evitando la desecación. Una vez en el laboratorio, se procedió a la caracterización de los ejemplares capturados.

2.3.1. Parámetros biométricos

Longitud del caparazón (LC): Longitud total, medida entre la unión de las espinas del rostro y el borde posterior del cefalotórax con un calibre al 0.1 milímetro más cercano (Fig. 2.10).

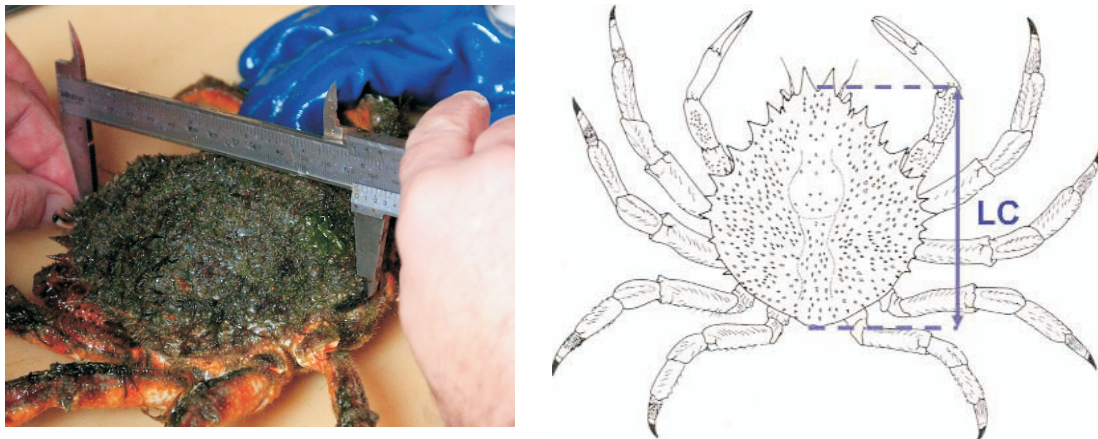


Fig. 2.10. Medida de la longitud del caparazón (LC).

Peso: Peso húmedo de cada ejemplar (g), medido con una balanza de precisión Salter Eletroscale ($\pm 0.01g$).

A continuación se procedió a la disección de las hembras (Fig. 2.11). Para ello se introdujo un cuchillo por la zona posterior del cefalotórax (línea de la ecdisis) y se levantó el caparazón hacia la parte anterior. Posteriormente, se extrajeron las gónadas de cada ejemplar.



Fig. 2.11. Detalle de la disección y recolección de los tejidos de las hembras.

2.3.2. Recolección de muestras de huevos

Se determinó la presencia de puesta mediante la observación de los pleópodos del abdomen. Se realizó una primera clasificación del desarrollo de los huevos en base a criterios macroscópicos (González-Gurriarán *et al.*, 1993) y se asignó el valor de coloración de los huevos en los diferentes estados en función del color más aproximado PantoneR Color Matching System (Pantone, Carlstadt, NJ 07072, USA; el color con su número correspondiente) encontrado en Adobe PhotoshopR (Adobe System, San Jose, CA 95110 USA) (Fig. 2.12).

- Estado I: huevos de color naranja (Pantone® 1514C o 152C), vitelo ocupa casi todo el volumen del huevo y sin pigmentación.
- Estado II: huevos de color naranja oscuro a marrón (Pantone® 1685C) con una ligera pigmentación (primeros cromatóforos).
- Estado III: huevos de color gris oscuro (Pantone® 440C) con pigmentación completa, embrión totalmente desarrollado y próximo a la eclosión.



Fig. 2.12. Detalle de los tres estados de desarrollo de las puestas.

A continuación se procedió a la extracción y procesado de las distintas muestras de huevos en función del estudio al que iban destinadas.

En los muestreos de medio natural (tercer y cuarto capítulo) se procedió a la extracción de los pleópodos de la hembra mediante un corte transversal en la base de los mismos, depositándolos sobre un tamiz con una luz de malla de 250 micras y sumergiéndolos en una solución de amonio formiato (31,5 g/l) durante 3 minutos, para eliminar las sales que puedan interferir en los análisis bioquímicos posteriores de las muestras. Durante el proceso de lavado, se extrajeron los huevos separándolos de las sedas de los pleópodos con unas pinzas finas. Una vez terminado el lavado, se secó la puesta con un papel de filtro para eliminar toda la solución sobrante y se pesó en una balanza de precisión Mettler Toledo Ag204 (± 0.0001 g).

En el cultivo de laboratorio (quinto capítulo) la extracción de las muestras de huevos se llevó a cabo introduciendo unas pinzas finas entre los pleópodos del abdomen de la hembra (Fig. 2.13).



Fig. 2.13. Detalle de la extracción de las submuestras de huevos en el cultivo.

Para el estudio de fecundidad (tercer capítulo), se tomaron cuatro tipos diferentes de submuestras:

- Submuestras de huevos (30 huevos aprox.) que se fijaron con formol al 4% (48 h.) y luego se conservaron en alcohol 70º hasta el momento de su medida. Se realizó el conteo de los huevos y la medida de su diámetro mayor y menor mediante un microscopio (40x) con un ocular provisto de micrómetro. A continuación se secaron en una estufa a 60ºC hasta peso constante y se determinó su peso seco con una balanza de precisión Mettler Toledo AG204 (± 0.0001 g).
- Submuestras de tamaño conocido para determinar el tamaño óptimo de muestra para estimar la fecundidad. Se llevó a cabo el conteo de muestras de 250, 500, 750, 1000 y 1500 huevos en una lupa binocular, y posteriormente se secaron en estufa a 60ºC hasta peso constante.
- Submuestras de 1000 huevos (tamaño muestral óptimo seleccionado) que se secaron en estufa a 60ºC hasta peso constante.
- Resto de puesta (tras extraer submuestras) secada en estufa a 60ºC hasta peso constante para determinar el peso seco total de la puesta.

Para el estudio de caracterización de las puestas (cuarto capítulo) cada puesta se dividió en dos submuestras de peso conocido: una submuestra de unos 30 huevos para su caracterización morfológica y biométrica, y otra muestra, que contenía el resto de la puesta tras la extracción de la submuestra anterior, para realizar los análisis bioquímicos posteriores. Por su parte, en el estudio de cultivo (quinto capítulo) la muestra consistió en aproximadamente 2 gr de peso fresco de huevos, para permitir la continuidad del desarrollo de la puesta.

Las submuestras de huevos (30 huevos aprox.), tanto de cultivo como de campo, se fijaron con formol al 4% (48 h.) y luego se conservaron en alcohol 70º hasta el momento de su medida. Para la realización de las medidas se dispusieron 30 huevos en una placa de metacrilato dividida en cuatro cuadrantes para facilitar la observación de las muestras. Esas placas se examinaron con un estereomicroscopio Nikon SMZ 1500, equipado con un sistema de fotografía DXM-Nikon 1200C, usando luz refleja de una fuente de fibra óptica. Se tomaron una serie de fotografías en el plano sagital de cada muestra de huevos.

A continuación, las fotografías fueron analizadas con un software de análisis de imagen NIS de Nikon. Este sistema de análisis de imagen fue calibrado empleando fotografías digitales de un micrómetro ajustado a la altura del plano medio de un embrión, usándose el valor medio ($\text{pixels} \cdot \text{mm}^{-1}$) de tres imágenes digitalizadas. Para la realización de las medidas llevo a cabo el trazado de líneas sobre el embrión empleando para ello el ratón del ordenador (Fig. 2.14).

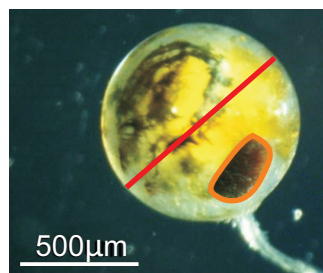


Fig.2.14. Detalle del trazado de líneas sobre la fotografía de un embrión en desarrollo.

En las muestras de medio natural (cuarto capítulo) solamente se midió la anchura (diámetro mayor o antero-posterior, AH) y la longitud (diámetro menor o dorso-ventral, LH) de los huevos. Además, se comprobó la ausencia de cualquier tipo de estructura, que demostraría que los huevos estaban en un estado recién desovado. En las muestras de cultivo (quinto capítulo), además de las medidas del huevo, se realizaron una serie de medidas de la mancha ocular (área, anchura (diámetro mayor o del eje antero-posterior, AO), longitud (diámetro menor o del eje dorso-ventral, LO) y el diámetro medio). A continuación, se estimó el volumen medio de los huevos (V), mediante la fórmula de un elipsoide: $V = \pi \cdot AH^2 \cdot LH / 6$ (Turner & Lawrence, 1979; Odinetz-Collart & Rabelo, 1996) y el índice ocular (IO), mediante la fórmula $IO = (AO + LO) / 2$ (Perkins, 1972).

Para la descripción cualitativa y cuantitativa del desarrollo embrionario, las muestras de cultivo fueron observadas durante su medición, anotándose los principales rasgos morfológicos (apéndices, lóbulos oculares, cromatóforos, etc) del huevo en cada momento de su desarrollo. Posteriormente, las fotografías de las mediciones fueron revisadas para obtener descripciones complementarias de las características morfológicas de los embriones fijados de cada muestra de huevos.

Para comprobar que la periodicidad en la recogida de muestras (cuatro días) durante las experiencias de cultivo era la adecuada para la caracterización del desarrollo embrionario, se realizó un seguimiento detallado en 3 hembras, cogiendo muestras de 40 huevos cada día. Cada muestra se dividió en dos, una parte se observó “in vivo” para mejorar la descripción de los rasgos morfológicos y la otra parte se sumergió en Bouin durante cinco minutos para facilitar la observación de algunas estructuras internas del embrión (Moriyasu & Lanteigne, 1998).

También se estimó el porcentaje de desarrollo de los huevos en cada día de recogida de muestra tomando como 0% el día de desove de los huevos y como 100% el día de eclosión de los huevos (tiempo de incubación) (Sandeman & Sandeman, 1991).

Las muestras de huevos restantes se congelaron a -30°C y se liofilizaron con un liofilizador Telstar Cryodos 50. Este proceso de liofilización basado en la desecación de una muestra previamente congelada, logra la sublimación del hielo bajo vacío, y permite ralentizar los procesos de degradación de los tejidos, logrando un mayor grado de conservación de los mismos. Posteriormente los huevos ya liofilizados fueron almacenados a -80°C hasta el momento del análisis bioquímico de los mismos.

2.3.3. Recolección de muestras de ovarios

En la fase previa a la extracción de este tejido, se determinó el estado de maduración gonadal siguiendo criterios macroscópicos (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998) y se asignó el valor de coloración de las gónadas en los diferentes estados macroscópicos en función del PantoneR Color Matching System (Pantone, Carlstadt, NJ 07072, USA; el color con su número correspondiente) encontrado en Adobe PhotoshopR (Adobe System, San Jose, CA 95110 USA) (Fig. 2.15):

- Estado I. Gónadas en reposo, de color blanco o crema claro (Pantone® 155C) Ovocitos inmaduros de pequeño tamaño con un diámetro mayor medio 264 µm.
- Estado II. Gónadas desarrollándose de color crema pálida a naranja claro (Pantone® 121C) Ovocitos con vitelo en formación, principalmente en el área externa y un diámetro mayor medio 453 µm.
- Estado III. Gónadas de color naranja (Pantone® 116C), ocupando una gran parte de la cavidad cefalotorácica. Ovocitos grandes con un diámetro mayor medio 673 µm.
- Estado IV. Gónadas de color naranja brillante (Pantone® 152C) totalmente desarrolladas, ocupando la totalidad de la cavidad cefalotorácica. Ovocitos grandes y bien desarrollados, con un diámetro mayor medio 845 µm.

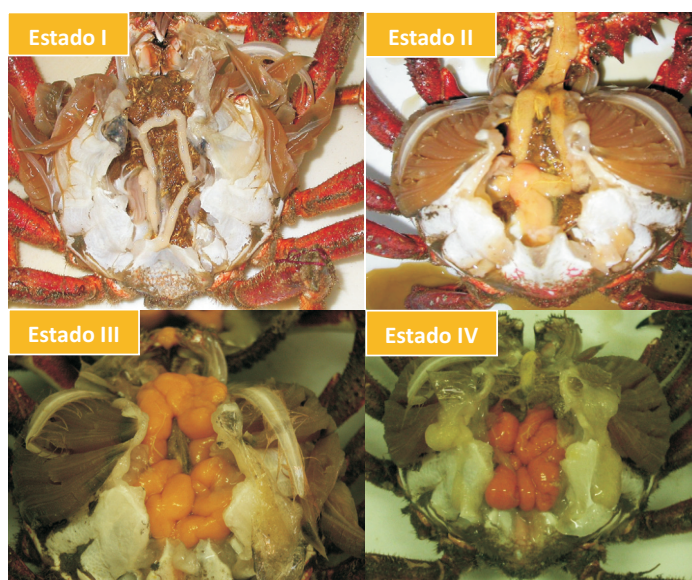


Fig. 2.15. Detalle de los cuatro estados de desarrollo de las gónadas.

A continuación se extrajeron las gónadas mediante el empleo de unas pinzas, depositándolas en un bote de polietileno previamente tarado para obtener su peso fresco en una balanza de precisión Mettler Toledo AG204 (± 0.0001 g) (Fig. 2.11). Cada gónada se dividió en dos submuestras de peso conocido: la primera submuestra (50 ovocitos aprox.) para la caracterización biométrica, y la segunda (la mayor parte de la gónada) para realizar los análisis bioquímicos posteriores.

Se calculó el índice gonadosomático (IG) empleando la siguiente fórmula (McRae & Mitchell, 1995; Sagi *et al.*, 1996):

$$IG = (\text{Peso fresco de la gónada} / \text{Peso total del ejemplar}) * 100$$

Las submuestras del tejido gonadal (50 ovocitos aprox.) se sumergieron en formol al 4% (48 h.) y luego se conservaron en alcohol 70° hasta el momento de su medida. De cada submuestra, se dispusieron entre 40 y 50 ovocitos en una placa de metacrilato dividida en cuatro cuadrantes para facilitar la observación de las muestras. Esas placas se examinaron con una estereomicroscopio Nikon SMZ 1500 equipado con un sistema de fotografía DXM-Nikon 1200C, usando luz refleja de una fuente de fibra óptica. Durante estas observaciones se tomaron una serie de fotografías que fueron analizadas con un software de análisis de imagen NIS de Nikon, procediéndose a la medida de la anchura (diámetro mayor, DMAO) y el diámetro medio (DMO) de los ovocitos.

Esta caracterización biométrica de los ovocitos permitió verificar la asignación de estados de desarrollo gonadal (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998) realizada de forma preliminar durante la evisceración de los ejemplares.

Las muestras de gónada restantes también se congelaron a -30°C y se liofilizaron siguiendo el mismo proceso que las muestras de huevos anteriores. Posteriormente las gónadas ya liofilizadas fueron almacenadas a -80°C hasta el momento del análisis bioquímico de las mismas.

2.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

Las técnicas analíticas que se describen a continuación fueron realizadas en el laboratorio de la Unidad de Recursos Bentónicos Marinos de la Universidad de La Coruña, a excepción del análisis de los ácidos nucleicos, realizado en la Estación Marina de Helgoland del Instituto Alfred Wegener de Investigación Marina y Polar (Alemania), el análisis elemental (CN) y la identificación y cuantificación de los ácidos grasos, que fueron realizados por la unidad de Técnicas Instrumentales de Análisis y la unidad de Técnicas Cromatográficas, de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de La Coruña respectivamente. El SAI está constituido por una serie de laboratorios o unidades técnicas dotadas de personal altamente especializado y de un equipamiento de alto nivel tecnológico.

Todas las analíticas realizadas con las muestras de los diversos tejidos de *M. brachydactyla* se hicieron por triplicado, exceptuando las del análisis elemental (CN) y de los ácidos grasos. Las réplicas cuyo coeficiente de variación fue superior al 10% fueron repetidas.

2.4.1. Contenido en agua

El contenido en agua de los tejidos se estimó a partir de las diferencias entre el peso húmedo y el peso seco de las muestras, obtenido tras la extracción del agua mediante un liofilizador (Telstar Cryodos 50). Una vez liofilizadas se mantuvieron con gel de sílice, que absorbe la humedad, en una atmósfera cerrada para su correcta conservación hasta el momento de la determinación de su peso en una balanza de precisión Metler MP460 (± 0.001 g).

2.4.2. Contenido en cenizas

El contenido en cenizas se estimó a partir de submuestras de 25 mg de tejido liofilizado que fueron depositadas en pocillos de porcelana de 6 ml previamente tarados y sometidas a incineración en un horno Mufla HK-11 Hobersal a 450°C durante 4 horas. Cuando la temperatura del horno hubo descendido hasta 100°C se retiraron los pocillos y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador, procediéndose a su pesada en una balanza de precisión Mettler Toledo AG 204 (± 0.0001 g) para su cuantificación.

2.4.3. Análisis elemental

La composición elemental (carbono y nitrógeno) de cada tejido se determinó a partir de submuestras de 2 a 3 mg de tejido liofilizado que fueron pesadas en una balanza de precisión Mettler Toledo UMX2 (± 0.00001 g). El método analítico para esta determinación se basa en la oxidación completa de la muestra mediante combustión instantánea. Para ello se utilizó un analizador elemental Carlo Erba CHNS-O EA 1108 con un catalizador de oxidación de óxido de cromo a 1020°C , un reductor de cobre de 650°C y una columna de gases Porapak de 2m de longitud y a 60°C . Durante el proceso los gases resultantes de la combustión son transportados mediante un gas portador (helio) a un flujo de 100 ml min^{-1} a través de un horno de reducción y de la columna de gases, donde son separados y eluidos como nitrógeno, dióxido de

carbono, agua y dióxido de azufre. La detección de estos elementos se realiza mediante un detector de conductividad térmica acoplado al analizador elemental, que emite una señal proporcional a la concentración de los componentes individuales de la muestra. Este instrumento se calibra con acetanilida, estándar aconsejado para muestras con elevado contenido orgánico. Para la adquisición y procesamiento de los resultados se empleó la aplicación EAGER 200 (Carlo Erba Instruments).

2.4.4. Contenido en proteínas

El contenido proteico de los tejidos se estimó de forma indirecta a partir de un factor de conversión del nitrógeno a proteínas. Aunque el factor de conversión empleado habitualmente en la literatura es el factor de conversión de 6.25, calculado por Jones (1931) para músculo de oveja, se ha demostrado que sobreestima entre un 10% y un 20% las proteínas en invertebrados (Diniz *et al.*, 2012). Por lo tanto, se ha optado por usar un factor de conversión de 5.78 que es el más adecuado para los organismos marinos (Gnaiger & Bitterlich, 1984). El contenido de proteínas se calculó a partir del contenido de nitrógeno obtenido con el análisis elemental (CN) de 2 a 3 mg de tejido liofilizado. Esta determinación a partir de la composición elemental ha sido utilizada anteriormente en otros crustáceos decápodos para la comparación de la composición proteica entre estados de desarrollo o entre diferentes especies (Anger & Harms, 1990; Anger, 1998, 2001).

2.4.5. Contenido en lípidos

2.4.5.1. Lípidos totales

Los lípidos se extrajeron mediante el método de Bligh & Dyer (1959), según Holland & Gabbot (1971) para su posterior cuantificación. Inicialmente se depositaron de 50 mg de tejido liofilizado (Mettler Toledo AG 204; ± 0.0001 g) en tubos de vidrio roscados de 10 ml (16 x 100 mm) previamente tarados, y se resuspendieron en 5 ml de metanol (CH_3OH): cloroformo (CH_2Cl_2) 2:1 V/V, homogenizando la muestra para facilitar la extracción. El metanol actúa disolviendo los lípidos polares, y el cloroformo los apolares. A continuación se centrifugaron los extractos durante 5 minutos a 800 g en una centrifuga refrigerada MPW-350R. Se recogió el sobrenadante en tubos de vidrio graduados de 10 ml (16 x 100 mm). Al precipitado residual se le sometió a una segunda extracción, resuspendiéndolo en 2 ml de metanol: cloroformo 2:1 V/V y centrifugándolo durante 5 minutos a 800 g. El sobrenadante se añadió al obtenido con la primera extracción y el precipitado fue desechado. Seguidamente, al extracto resultante se le añadieron cloroformo y agua destilada Milli-Q para obtener una relación final de solventes metanol: cloroformo: agua 2:2:1 V/V. Se agitó con un agitador vortex hasta la total homogenización de la muestra y se centrifugó nuevamente, formándose dos fases: una fase acuosa superior y una fase orgánica inferior. La fase acuosa se extrajo con una pipeta Pasteur y se desechó. A la fase orgánica se le añadieron 0,5 ml de acetona (CH_3COCH_3) para eliminar las posibles trazas de agua que pudieran haber quedado. Los extractos lipídicos obtenidos se secaron en un evaporador centrífugo Jouan RC1010 con trampa de frío RCT90 a 40°C hasta la total evaporación de los solventes. En el caso de que los extractos no fueran analizados inmediatamente, se almacenaron a -32°C en 300 μl de cloroformo con BHT (Butilhidroxitolueno) como antioxidante.

La cuantificación del contenido lipídico se llevó a cabo siguiendo el método de estimación gravimétrica no destructiva. Para ello se resuspendieron los extractos de lípidos con 300 μl de cloroformo y a continuación se trasvasaron a viales de vidrio de 3 ml previamente tarados. Los viales se secaron en el evaporador centrífugo a 40°C hasta la evaporación total del solvente. A continuación se enfriaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesaron en una balanza de precisión Mettler Toledo AG 204 (± 0.0001 g). El peso resultante corresponde a la cantidad de lípidos totales presentes en la muestra inicial de tejido liofilizado.

2.4.5.2. Clases de lípidos

La obtención de las tres principales fracciones lipídicas (neutrolípidos, glucolípidos y fosfolípidos) se llevó a cabo mediante una extracción líquido-sólido, siguiendo el método de Sukenik *et al.* (1989). Para ello, el extracto lipídico obtenido se resuspendió en 300 µl de cloroformo, y la disolución resultante se cargó en una columna cromatográfica de sílice activo (Sep-Pak Silica Cartridges; Waters WAT051900) previamente acondicionada con cloroformo. Seguidamente se le acopló a la columna un embudo de poliestireno de 50 ml en uno de sus extremos. A través del embudo se hicieron pasar sucesivamente a la columna volúmenes de 20 ml de cloroformo, cloroformo: metanol 85:15 (V/V) y metanol, con el fin de eluir las fracciones de neutrolípidos, glucolípidos y fosfolípidos, respectivamente. Los volúmenes de 20 ml de cada fracción lipídica fueron recogidos por separado en tubos de vidrio de 30 ml. A continuación, se introdujo cada fracción lipídica en un evaporador centrífugo a 40°C hasta la evaporación total del cada solvente.

Para la cuantificación de las fracciones lipídicas se siguió el método de estimación gravimétrica no destructiva descrito anteriormente, obteniéndose la cantidad de fosfolípidos, glucolípidos y neutrolípidos presentes en la fracción de lípidos totales de la muestra inicial de tejido liofilizado.

2.4.5.3. Ácidos grasos

El análisis de los ácidos grasos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (CG-EM). Se empleó la técnica de Lepage & Roy (1984) para la preparación de los derivados metil-éster de los ácidos grasos (AGMEs). Esta técnica incluye cuatro fases fundamentales: saponificación de la muestra, metilación de los ácidos grasos, extracción a partir de la fase acuosa y lavado final.

Para corregir las variaciones que se puedan producir durante la preparación de la muestra y que serán debidas a diferencias en la eficacia de la saponificación, derivatización o en la extracción líquido/líquido de los ácido derivatizados, al iniciar el procedimiento se añadió a cada una de las muestras una cantidad conocida de un compuesto que se comporta de una forma similar a los compuesto de interés a lo largo de las distintas etapas a las que se somete la muestra y que se denomina estándar interno. En este caso y tras realizar un estudio con muestras de ovario y huevos en diferentes estados de desarrollo o maduración, se eligió el ácido graso C17:0 para tal fin.

El proceso inicial de saponificación de los lípidos consiste en hidrolizar los ácidos grasos de los ésteres del colesterol, triglicéridos y fosfolípidos, convirtiéndolos en jabones solubles en agua. Para ello, se tomaron muestras de 25 mg de tejido liofilizado en tubos de vidrio roscados de 10 ml, previamente tarados y se les adicionaron 2 ml de una solución de NaOH 1.2 N en metanol acuoso al 50% y 20 µl de la disolución del estándar interno C17:0, calentando a 90-100°C durante 30 minutos. Tras enfriar el saponificado a temperatura ambiente, se acidificó con 1 ml de HCL 6N a pH inferior a 2. Posteriormente, se procedió a la derivatización de las fracciones lipídicas añadiéndose a la solución 1 ml de BF₃ al 14% en metanol para catalizar la metilación. Esta solución se calentó en un termobloque P-Selecta 85°C durante 5 minutos. Seguidamente, se adicionó 1 ml de hexano: dietiléter (1:1) V/V para la extracción de los ésteres metílicos y se procedió a la agitación suave de las muestras durante 3 minutos. Tras la agitación se forman dos fases: una fase orgánica superior y una fase acuosa inferior, la cual se desechó mediante su extracción con una pipeta Pasteur. El extracto orgánico se lavó con 3 ml de NaOH 0.3 N y se sometió nuevamente a una agitación suave durante un minuto. Esto permitió una nueva separación en dos fases: una fase inferior acuosa y una fase superior orgánica. Esta última fase fue recogida mediante una pipeta Pasteur y transvasada a un vial de forma cónica (1 ml).

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó en un cromatógrafo de gases Thermo Finnigan Trace GC equipado con un automuestreador CTC PAL GC y acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica Thermo Finnigan Polaris Q. Los compuestos de interés se separaron con una columna Supelco SP-2330 de 30 m y 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de película de fase estacionaria, que se sometió a un gradiente térmico de 1.5°C/min comenzando por una temperatura inicial de 120°C hasta alcanzar los 162°C, luego una isoterma a 162°C durante 13 minutos y otro gradiente térmico de 1.5°C/min desde 162°C hasta 200°C. Como gas portador se utilizó helio a flujo constante (1 mL/min). La inyección se realizó en modo split con una proporción 1:50, a una temperatura de 260°C y se inyectó un volumen de 1 μL . La detección se realizó con el espectrómetro trabajando con ionización electrónica positiva a 70 eV y en modo full-scan barriendo un rango de masas de 45 a 400 uma. La línea de transferencia se mantuvo a una temperatura de 230°C.

La cuantificación se realizó por el método del patrón interno calculándose el factor de respuesta de cada uno de los ácidos grasos con respecto al estándar interno, en este caso C17:0. A partir de una mezcla comercial de 37 metil ésteres de ácidos grasos (Supelco F.A.M.E. Mix, C4-C24, 18919) se prepararon disoluciones patrón en hexano para el cálculo de los factores de respuesta a distintas concentraciones, de esta manera se comprobó la linealidad de la respuesta en el rango de trabajo. Dichos factores se emplearon en el cálculo normalizado del porcentaje y cantidad absoluta de cada compuesto.

El procesamiento de los resultados cromatográficos se efectuó con el software Xcalibur 1.4. Cada metil éster de ácido graso se identificó por su tiempo de retención cromatográfico y su espectro de masas, tanto por comparación con el patrón de trabajo y como con los espectros almacenados en la librería NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST08). Para la integración de los compuestos de interés se escogió la relación masa/carga más intensa de su espectrómetro de masas.

2.4.6. Contenido en carbohidratos

El contenido de carbohidratos se estimó mediante el método colorimétrico del fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956) partiendo de 10 mg de tejido liofilizado. Este método deriva del test de Molisch e implica el calentamiento de la muestra con ácido sulfúrico concentrado y un desarrollante del color que normalmente es un fenol o una amina aromática (en este estudio se empleó el fenol, Herbert *et al.*, 1971). Al liófilo, depositado en un eppendorf, se le adicionó 1 ml de agua Milli-Q y se homogenizó con un disruptor (POLYTRON PT1600E) de 30 a 50 segundos. Seguidamente, se realizó una dilución 1/2 y se extrajo una alícuota de 100 μL para un nuevo eppendorf. Asimismo, se prepararon las diferentes concentraciones de la curva de calibración utilizando glucosa (2 mg/ml), y se extrajo una alícuota de 100 μL de cada concentración de la curva para nuevos eppendorf. A las alícuotas se le adicionaron 200 μL de fenol al 5.4% y se agitaron con un vortex durante 30 segundos. Luego se añadió 1 ml de ácido sulfúrico 96%, volviéndose a agitar el eppendorf 30 segundos en el vortex y dejándose enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Para la cuantificación se cargaron en una microplaca de 96 pocillos alícuotas de 250 μL de cada muestra por cuadruplicado, y de cada concentración del patrón por triplicado. A continuación la microplaca cargada fue leída a una absorbancia de 490 nm en un lector de microplacas (ELX800 Bio-Tec Instruments Inc.) para cuantificar el contenido en carbohidratos de las muestras.

2.4.7. Contenido en ácidos nucleicos

Para la determinación del contenido de ARN y ADN se utilizó una modificación del método de Clemmesen (1993) y Mokness *et al.* (2000). Se pesaron 1-2 mg de tejido liofilizado y se rehidrataron con 400 µl de Tris-SDS-buffer (Tris 0.05M, NaCl 0.01M, EDTA 0.01M, SDS 0.02%) durante 15 minutos. A continuación, se homogenizó la muestra con un sonicador Sonifer Branson Cell Disruptor B15 durante 5 segundos para la rotura de las células. El homogenizado resultante se centrifugó a 6600 rpm en una centrifuga refrigerada a 4°C durante 8 minutos. El sobrenadante fue dividido en 2 alícuotas, una para medir el total de ácidos nucleicos y la otra para estimar el ADN después de la digestión con ARNasa (Ribonucleasa A, procedente de páncreas bovino).

Para la cuantificación del contenido de ácidos nucleicos se empleó un espectrofluorímetro Kontron Instruments SFM 25 y como fluorocromo el bromuro de etidio (0.1 mg/ml). La fluorescencia fue medida con una longitud de onda de excitación de 365nm, y de 590nm de emisión. Como blanco se empleó el Tris-buffer (Tris 0.05M, NaCl 0.01M, EDTA 0.01M, pH 8), y como estándares para las curvas de calibración se emplearon Lambda DNA (0.025 µg/µl) y 16S/23S ribosomal RNA (0.02 µg/µl).

Para la determinación del contenido total de ácidos nucleicos se depositaron en una cubeta de poliestireno 150 µl del homogenado y 350 µl Tris-buffer, agitando la mezcla con una varilla de plástico. A continuación, se llevo a cabo la primera lectura de fluorescencia y seguidamente, con la adición de 50 µl bromuro de etidio, se realizó la segunda lectura. Por otro lado, se estimó el contenido en ADN, poniendo en una cubeta de poliestireno 150 µl del homogenado, 300 µl Tris-buffer y 50 µl de ARNasa, agitando la mezcla con una varilla de plástico. Durante 30 min se incubó a 37°C la solución en agitación para la completa degradación del ARN por la enzima. Después se añadieron a la solución 50 µl de bromuro de etidio y se procedió a la lectura de la fluorescencia obteniéndose el contenido en ADN. El contenido de ARN se estimó por diferencia entre el contenido en ADN y el contenido total en ácidos nucleicos. Durante todo el proceso la muestra se mantuvo en hielo para evitar posibles degradaciones del material genético.

2.4.8. Contenido en energía

La cuantificación de la energía se realizó con dos métodos diferentes, el método de Winberg (1971) y el de Salonen *et al.* (1976).

En la cuantificación de la energía según Winberg, el contenido de energía se obtiene a partir del contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos de una muestra. Para ello se emplea la fórmula:

$$\text{Energía}^W (\text{J}) = \text{Energía}^{\text{Lípidos}} + \text{Energía}^{\text{Proteínas}} + \text{Energía}^{\text{Carbohidratos}}$$

$$\text{Energía}^{\text{Lípidos}} (\text{J}) = 39.54 (\text{J/mg}) * \text{Lípidos (mg)}$$

$$\text{Energía}^{\text{Proteínas}} (\text{J}) = 23.64 (\text{J/mg}) * \text{Proteínas (mg)}$$

$$\text{Energía}^{\text{Carbohidratos}} (\text{J}) = 17.15 (\text{J/mg}) * \text{Carbohidratos (mg)}$$

Mientras que, con el método de Salonen, la energía se estima a partir del contenido de carbono de una muestra con la siguiente fórmula:

$$\text{Energía}^S (\text{J}) = 46 (\text{J/mg}) * \text{Carbono (mg)}$$

2.5 . ANALISIS ESTADISTICO

Todos los análisis estadísticos y el ajuste de modelos descritos en esta tesis fueron realizados con el software libre R (R Core Team (2015)). Todos los grupos de datos utilizados en las diferentes secciones de esta tesis fueron sometidos a una exploración previa siguiendo el protocolo propuesto por Zuur *et al.*, 2010. Se verificó la normalidad y la homogeneidad de varianza de los residuos de los análisis mediante la prueba de Shapiro y el test de homogeneidad de varianzas de Fligner-Killeen. En aquellos casos donde no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianza, se llevaron a cabo ANOVAs con matrices de covarianzas con corrección de heterocedasticidad (HCCM: heterocedasticity consistent covariance matrix), ya que con este tipo de matrices de covarianzas, el ANOVA es robusto incluso en presencia de heterocedasticidad. Se seleccionó una HCCM denominada HC3, que funciona con tamaños de muestra menores de 25 (Long & Ervin, 2000). En todos los casos los p valores de este análisis fueron consistentes con los p valores obtenidos con los ANOVA sin la corrección, por lo que se concluyó que los p valores de los modelos tienen una elevada fiabilidad.

El efecto de la talla de las hembras sobre las variables de estudio de cada uno de los capítulos de esta tesis se testó mediante modelos de regresión. Aquellos casos que mostraron un efecto significativo de la talla sobre una variable en concreto, se realizó una estandarización de los datos de dicha variable antes de la realización de los análisis estadísticos.

3

**CAMBIOS DE LA FECUNDIDAD DE LA CENTOLLA,
M. BRACHYDACTYLA (CRUSTACEA:BRACHYURA)
ENTRE PUESTAS SUCESIVAS**

3.1. INTRODUCCIÓN

La centolla *Maja brachydactyla* (Balss, 1922) (Crustacea, Brachyura) es un cangrejo de la familia Majidae de amplia distribución geográfica, desde las Islas Británicas hasta Senegal, cuyas poblaciones están sometidas a una intensa actividad pesquera, sobre todo en Galicia (NW, Spain), que constituye una de sus principales zonas de explotación.

Debido al interés ecológico, económico y social de *M. brachydactyla*, el estudio de la biología de esta especie es fundamental para el mantenimiento de sus poblaciones sometidas a explotación comercial. Galicia es una de las zonas de su área de distribución donde se ha estudiado a fondo su biología (González-Gurriarán, 1993, 1995, 1996, 1998; Freire *et al.*, 1999; Bernárdez *et al.*, 2000; González-Gurriarán *et al.*, 2002; Sampedro *et al.*, 2003; Corgos, 2004; Corgos & Freire, 2006; Corgos *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2009), aunque todavía no existe información sobre su potencial reproductivo en términos de fecundidad (número de huevos) y peso de la puesta.

Conocer la fecundidad y el número de puestas de una especie permite estimar su potencial reproductivo y el tamaño del stock de una población (Mori *et al.*, 1998; Hattori & Pinheiro, 2003; Figueiredo *et al.*, 2008a). Generalmente, la fecundidad se define como el número de huevos liberados por una hembra en un solo proceso de desove o durante un periodo determinado de su ciclo vital (Jones & Simons, 1983). El número de huevos que constituyen la puesta y sus características biométricas dependen directamente de las reservas energéticas y del esfuerzo que cada hembra destine a la reproducción, lo cual está estrechamente relacionado tanto con factores ambientales (principalmente la temperatura y la disponibilidad de alimento) como de la biología de la especie (fundamentalmente su tamaño, el tiempo transcurrido desde la muda terminal o las sucesivas puestas). En algunas especies de la familia Majidae como *Chionoecetes bairdi* (Somerton & Meyers, 1983), *Chionoecetes opilio* (Sainte Marie, 1993) o *Inachus dorsettensis* (Bryant & Hartnoll, 1995) se ha puesto de manifiesto la influencia de estos factores ambientales y biológicos tanto en la fecundidad como en el potencial reproductivo.

En este trabajo se abarca el estudio del potencial reproductivo de *Maja brachydactyla* a partir de puestas de diferentes hembras en distintas épocas a lo largo de dos ciclos de cría. Se pretenden describir las características generales de sus puestas (número, tamaño de los huevos y peso total de las puestas) y las variaciones interanuales (ciclos de cría, 1992 y 1998), estacionales (primera o posteriores puestas) y debidas a la talla de la hembra. Esta información es fundamental y puede ser aplicada al desarrollo de medidas oportunas para la gestión de la pesca de este recurso, de gran importancia socio-económica en Galicia, que permitan la conservación de sus poblaciones.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Muestreo

Los muestreos de hembras ovígeras de *M. brachydactyla* se llevaron a cabo durante dos ciclos de cría diferentes, correspondientes a los años 1992 y 1998, en una de las principales zonas de explotación de este crustáceo, la ría de Arousa (NW, España). Dentro de cada ciclo de cría se distinguieron dos periodos de puesta, en invierno (diciembre, febrero y marzo), momento en el que las hembras se encuentran

realizando la primera puesta, y en primavera-verano (mayo a septiembre), cuando están desarrollando las puestas posteriores (segunda y tercera puesta). No se incluyó el mes de abril por ser el mes intermedio entre puestas, donde pueden coincidir hembras realizando la primera puesta y hembras realizando las puestas posteriores. Todas las hembras seleccionadas presentaban los huevos de color naranja claro (estado I), que se correspondían con la clasificación macroscópica de González-Gurriarán *et al.* (1993) (la información sobre el método y la zona de pesca puede ser consultada en el apartado de “Área de Estudio” dentro de “Metodología general”, página 15).

En total se seleccionaron 77 hembras ovígeras, 40 en el ciclo de cría de 1992 (14 realizando la primera puesta y 26 llevando a cabo las puestas posteriores) y 37 en el ciclo de cría de 1998 (13 en la primera puesta y 24 en las puestas posteriores).

3.2.2. Preparación de las muestras

Las hembras fueron trasladadas al laboratorio en neveras portátiles con bloques congelados y paños humedecidos en agua de mar para mantener un nivel mínimo de temperatura y humedad que ralentice el metabolismo de los individuos y evite su desecación. En el laboratorio los ejemplares fueron caracterizados biométricamente siguiendo la metodología descrita en el apartado “Preparación de las Muestras” dentro del capítulo de “Metodología General” (página 21).

De cada hembra, se recogieron las submuestras de la puesta necesarias para determinar:

- El tamaño óptimo de muestra para estimar la fecundidad: se llevó a cabo el conteo de muestras de 250, 500, 750, 1000 y 1500 huevos bajo una lupa binocular.
- La medida del volumen y peso individual de los huevos: sobre submuestras de huevos (30 huevos) conservadas en alcohol 70º se realizó el conteo de los huevos y la medida de su diámetro mayor y menor mediante un microscopio (40x) con un ocular provisto de micrómetro.
- La estimación de la fecundidad: se llevó a cabo el conteo del tamaño óptimo de huevos elegido bajo una lupa binocular.

Todas las submuestras se secaron en una estufa a 60ºC hasta peso constante y se determinó su peso seco con una balanza de precisión Mettler Toledo AG204 (± 0.0001 g). El resto de la puesta (tras extraer submuestras) también fue secada en estufa a 60ºC hasta peso constante para determinar el peso seco total de la puesta.

La fecundidad se estimó mediante el método gravimétrico, realizando el conteo de submuestras de huevos bajo una lupa binocular (40x) y pesándolas posteriormente tras secarlas en una estufa a una temperatura de 60ºC hasta peso constante.

El volumen de los huevos se estimó midiendo su diámetro mayor y menor en muestras de 30 huevos de cada puesta con la ayuda de un microscopio (40x). El volumen medio de los huevos (V) se calculó mediante la fórmula de un elipsoide: $V = \pi \cdot AH^2 \cdot LH / 6$ (Turner & Lawrence, 1979; Odinetz-Collart & Rabelo, 1996).

3.2.3. Análisis estadístico

El efecto de la talla de las hembras (LC) en el peso seco de la puesta, en el número de huevos y en su tamaño fue analizado mediante la ecuación: $Y = a + b \cdot X^b$, al igual que en otras especies de crustáceos decápodos (Somers, 1991; Brante *et al.*, 2003).

El efecto de la talla de las hembras en el ciclo de cría (1992 y 1998) y en cada periodo de puesta (primera y posteriores puestas) dentro de cada ciclo de cría fue testado mediante un análisis de la covarianza (ANCOVA), comprobándose por medio de los test de Cochran y Barlett-Box la inexistencia de homogeneidad entre las varianzas residuales obtenidas ($p > 0.05$).

Asimismo, se han estudiado por medio de análisis de la varianza (ANOVA), las diferencias temporales de la fecundidad y del peso seco de la puesta, así como de las características biométricas (volumen y peso) de los huevos tanto entre ciclos de cría (1992 y 1998) como entre periodos de puesta (primera y posteriores puestas). Para estos análisis los datos de fecundidad y peso seco total de la puesta fueron estandarizados por la talla.

Para comparar ambos ciclos de cría, los datos mensuales correspondientes al ciclo de cría de 1992 se agruparon previamente basándose en la información existente sobre la biología reproductiva de *M. brachydactyla* en la zona de estudio (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1996, 1998). Se consideró que las hembras capturadas en los meses de diciembre, febrero y marzo se encontraban realizando la primera puesta, y aquellas capturadas desde mayo a septiembre realizaban su segunda puesta, excluyéndose las hembras del mes de abril por ser un mes donde coinciden hembras realizando la primera y la segunda puesta.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Estudio de tamaño óptimo de muestra para estimación de fecundidad

En el estudio del tamaño óptimo de las submuestras de huevos (250, 500, 750, 1000 huevos) para la estimación de la fecundidad, se observó que el tamaño de la submuestra influye en las estimas del peso seco por huevo ($p < 0.05$). El peso seco medio por huevo disminuyó con el aumento del tamaño de la muestra y la variabilidad fue mayor para tamaños de submuestras inferiores a 500 huevos (Fig. 3.1). El empleo de submuestras de un número pequeño de huevos podrían sobreestimar los valores de peso seco por huevo e infraestimar los valores de fecundidad estimados.

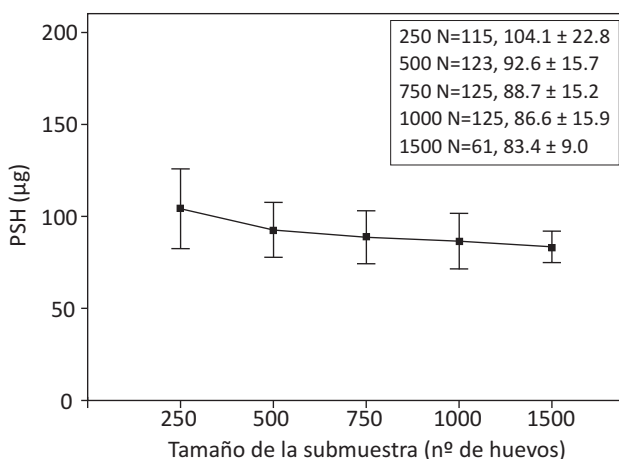


Fig. 3.1. Relación entre el peso seco (μg , PSH) medio de los huevos y el tamaño (número de huevos) de las submuestras de huevos de centolla. Los puntos representan la media y las barras la desviación estándar o típica. Los datos del recuadro representan el número de muestras (N), la media y la desviación estándar o típica de cada uno de los tamaños de submuestra (250, 500, 750, 1000, 1500) analizados.

Las estimas de fecundidad obtenidas a partir del peso por huevo de las submuestras de 750 (222526 ± 58216 huevos) y 1000 (228437 ± 58216 huevos) huevos no presentaron diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$). No obstante, se eligió la submuestra de 1000 huevos como el tamaño óptimo para la estimación de la fecundidad, ya que pequeñas diferencias en el peso del huevo pueden provocar grandes diferencias en las estimas de fecundidad, especialmente en puestas de gran tamaño.

3.3.2. Características generales de las puestas de *M. brachydactyla*

Se ha observado una gran variabilidad en el esfuerzo reproductivo de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa tanto a nivel de puestas (número de huevos y peso seco de la puesta) como a nivel de los huevos individuales (volumen y peso seco) en los dos periodos estudiados. Así, el número de huevos por puesta (fecundidad) osciló entre 125081 y 530309 huevos (300192 ± 92912 huevos) para ejemplares de 132.5 mm hasta 191.3 mm (157.8 ± 13.3 mm) de longitud de caparazón mientras que, el peso seco de la puesta varió desde 10.7 hasta 43.9 g ($27.1 \text{ g} \pm 8.3 \text{ g}$).

En cuanto a los huevos individuales, el volumen varió entre 0.158 y 0.262 mm³, con un valor medio de $0.216 \text{ mm}^3 \pm 0.026 \text{ mm}^3$, que corresponde a huevos con un diámetro mayor de 0.75 mm y un diámetro menor de 0.72 mm. El peso seco osciló de 74.2 µg hasta 115.7 µg, con un peso medio de $89.5 \pm 8.0 \text{ µg}$.

3.3.3. Variaciones de las puestas con la talla corporal de las hembras

Los análisis de regresión indicaron que la talla de las hembras está positivamente correlacionada ($p < 0.01$) tanto con la fecundidad como con el peso seco de la puesta, para los dos periodos estudiados, 1992 y 1998 (Fig. 3.2). Dentro de cada periodo también se observó una correlación positiva ($p < 0.05$) entre estas variables tanto para los datos correspondientes a la primera como a las puestas sucesivas.

El ANCOVA realizado para comparar la variación entre la talla corporal y la fecundidad de la hembra en los dos periodos de estudio, mostró diferencias significativas ($p < 0.01$) en ambos periodos anuales. El incremento en el número de huevos para un incremento dado de la talla resultó ser muy superior en las hembras de 1992, siendo la pendiente de la recta ajustada de 2.25 frente 1.38.

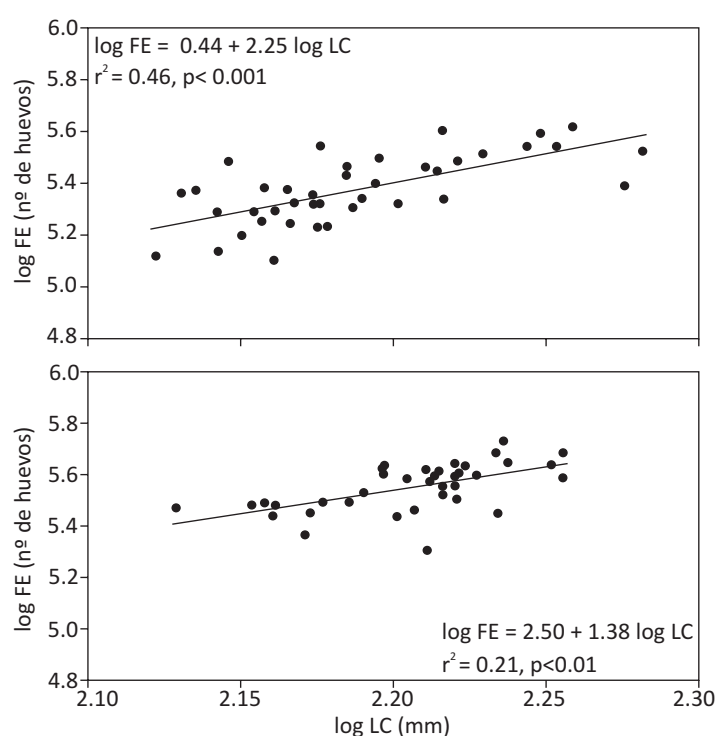


Fig. 3.2. Relación entre fecundidad (número de huevos, FE) y tamaño (mm, LC) de las hembras de centolla para los ciclos de cría del 1992 (superior) y 1998 (inferior). Se representa la recta ajustada mediante técnicas de regresión para el total de los individuos de 1992 y de 1998.

La variación entre la talla corporal y el peso seco de la puesta en los dos periodos de estudio también mostró diferencias significativas ($p < 0.01$) en ambos periodos anuales (Fig. 3.3). El incremento en el peso seco de la puesta para un incremento dado de la talla resultó ser muy superior en las hembras de 1992, siendo la pendiente de la recta ajustada de 2.43 frente al 1.97 obtenido en las hembras de 1998.

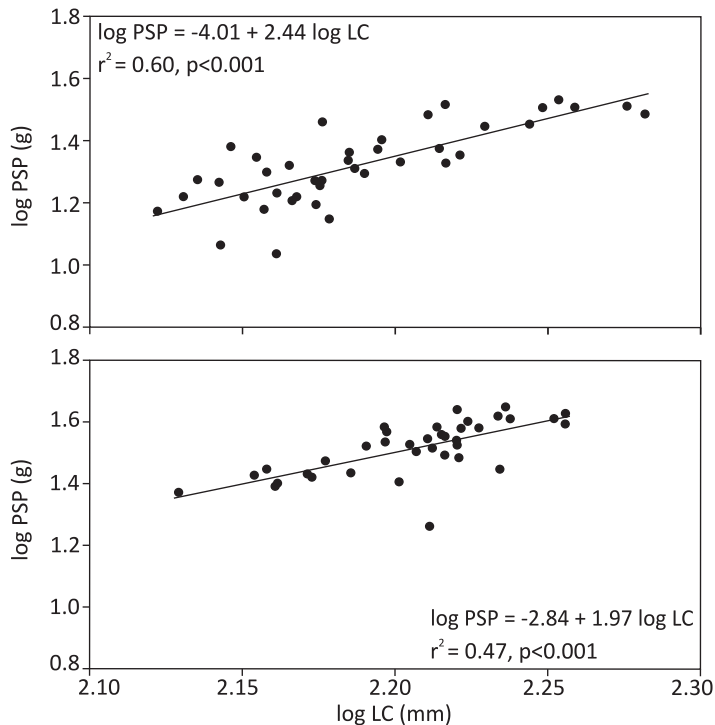


Fig. 3.3. Relación entre peso seco de la puesta (g, PSP) y tamaño (mm, LC) de las hembras de centolla para los ciclos de cría del 1992 (superior) y 1998 (inferior). Se representa la recta ajustada mediante técnicas de regresión para el total de los individuos de 1992 y de 1998.

En cuanto a las variaciones de la fecundidad con la talla en las diferentes puestas de un mismo periodo anual, las pendientes observadas reflejan la inexistencia de un patrón común para los dos años estudiados ($p > 0.05$). Mientras en 1992 la pendiente de la recta ajustada es superior en las puestas posteriores (2.73) que en la primera (2.32), en 1998 la pendiente de la recta ajustada es mayor en la primera puesta (2.37) que en las puestas posteriores (1.49) (Fig. 3.4).

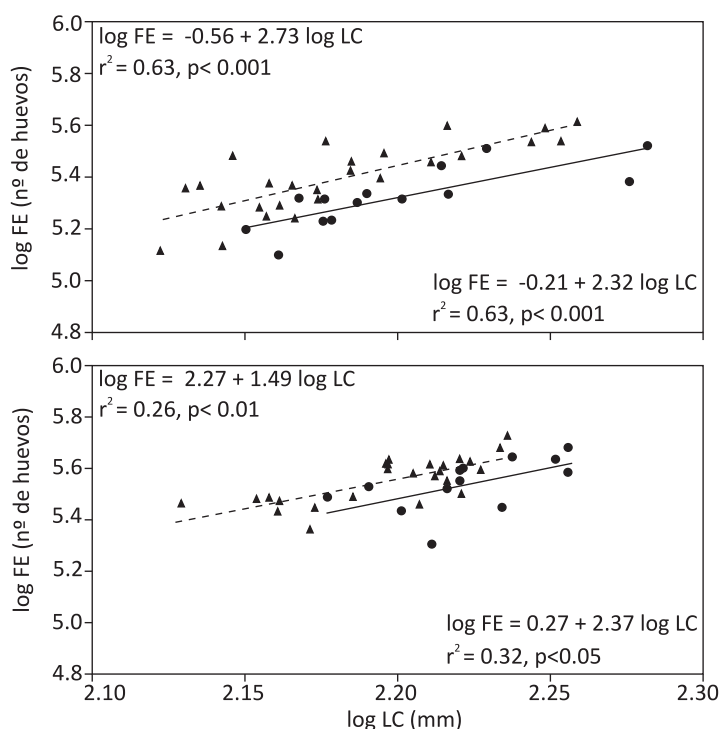


Fig. 3.4. Relación entre fecundidad (número de huevos, FE) y tamaño (mm, LC) de las hembras de centolla de las diferentes épocas del 1992 (superior) y 1998 (inferior). Se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión para los individuos de la primera (o, línea continua) y posteriores puestas (Δ , línea discontinua) de 1992 y de 1998.

Por el contrario, en la variación del peso seco de la puesta con la talla en las diferentes puestas de un mismo periodo anual, las pendientes observadas reflejan un patrón similar en los dos años estudiados. Así, en las primeras puestas el incremento del peso seco de la puesta con un incremento dado de la talla es mayor que en las puestas sucesivas tanto para 1992 como para 1998 ($p < 0.05$) (Fig. 3.5).

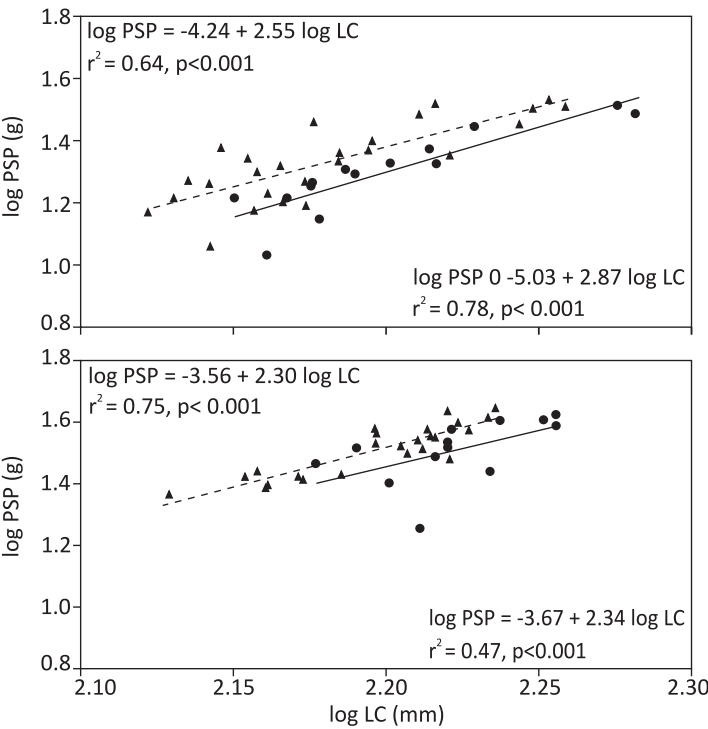


Fig. 3.5. Relación entre peso seco de la puesta (g, PSP) y tamaño (mm, LC) de las hembras de centolla de las diferentes épocas del 1992 (superior) y 1998 (inferior). Se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión para los individuos de la primera (o, línea continua) y posteriores puestas (Δ , línea discontinua) de 1992 y de 1998.

Las diferencias obtenidas entre puestas en la relación de la fecundidad con la talla con respecto a los resultados obtenidos en la relación del peso seco de la puesta con la talla contrastan con la correlación existente entre la fecundidad y el peso seco de la puesta. Dado que dicha correlación es significativa, tanto para los dos ciclos de cría como para cada época dentro del ciclo de cría (Tabla 3.1), cabría esperar que siguieran un patrón similar entre la talla y ambas variables.

Tabla 3.1. Relación entre fecundidad (número de huevos, FE) y peso seco de la puesta (g, PSP) de las hembras de centolla de las diferentes épocas del 1992 y 1998. Se indican los parámetros de las ecuaciones de regresión ajustadas para el total de las puestas, y para la primera y las posteriores puestas separadamente, así como los respectivos coeficientes de regresión (r^2), estadístico (F) y significación (P).

| Año | Puesta | N | FE x PSP | | | |
|------|-------------|----|--|-------|--------|-----------|
| | | | Ecuación | r^2 | F | P |
| 1992 | Total | 40 | $\text{FE} = 4.12 \cdot \text{PSP}^{0.95}$ | 0.81 | 164.50 | < 0.001 |
| | Primera | 14 | $\text{FE} = 4.28 \cdot \text{PSP}^{0.80}$ | 0.79 | 44.70 | < 0.001 |
| | Posteriores | 26 | $\text{FE} = 4.07 \cdot \text{PSP}^{0.99}$ | 0.85 | 136.40 | < 0.001 |
| 1998 | Total | 37 | $\text{FE} = 4.07 \cdot \text{PSP}^{0.98}$ | 0.87 | 240.00 | < 0.001 |
| | Primera | 13 | $\text{FE} = 4.05 \cdot \text{PSP}^{0.98}$ | 0.97 | 322.14 | < 0.001 |
| | Posteriores | 24 | $\text{FE} = 4.08 \cdot \text{PSP}^{0.97}$ | 0.81 | 96.75 | < 0.001 |

Las regresiones realizadas para el estudio de la relación entre el tamaño de los huevos (volumen y peso seco) y la talla de las hembras, han reflejado la inexistencia de correlación entre las dos variables, tanto para los periodos anuales (1992 y 1998) ($p > 0.05$) como para las diferentes puestas dentro de cada periodo anual (primera y puestas posteriores) ($p > 0.05$).

3.3.4. Variaciones interanuales en el tamaño de las puestas (1992/1998)

El análisis de las características de la puesta de *Maja brachydactyla* en los diferentes años estudiados ha reflejado la existencia de diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) tanto en el número de huevos que la constituyen como en el peso seco total, y en las características individuales de los mismos (volumen y peso).

Los valores medios de la fecundidad y del peso seco de la puesta, estandarizados por la talla de las hembras, han sido significativamente mayores en 1998 frente a 1992 (ANOVA, $p < 0.01$) tanto para la totalidad del ciclo de cría anual como para la primera y posteriores puestas separadamente (Fig. 3.6).

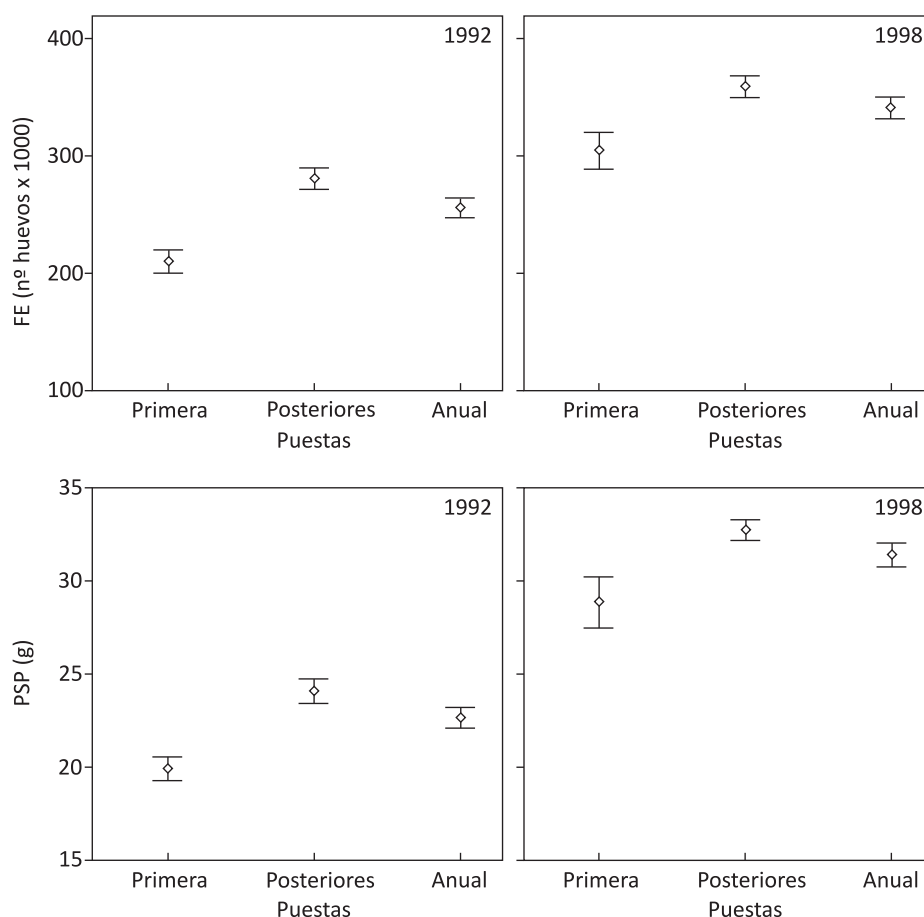


Fig. 3.6. Fecundidad media (número de huevos, FE) y peso seco medio (g, PSP) estandarizados por la talla. Se representan los datos de la primera y posteriores puestas de *Maja brachydactyla* correspondiente a los ciclos de cría de 1992 y 1998.

Para las características biométricas del huevo, únicamente se obtuvieron diferencias interanuales significativas (ANOVA, $p < 0.05$) en el volumen medio del huevo de las posteriores puestas, siendo mayor en las puestas de 1992, con un volumen medio de 0.241 y 0.226 mm³ para la primera y las posteriores puestas respectivamente (Fig. 3.7).

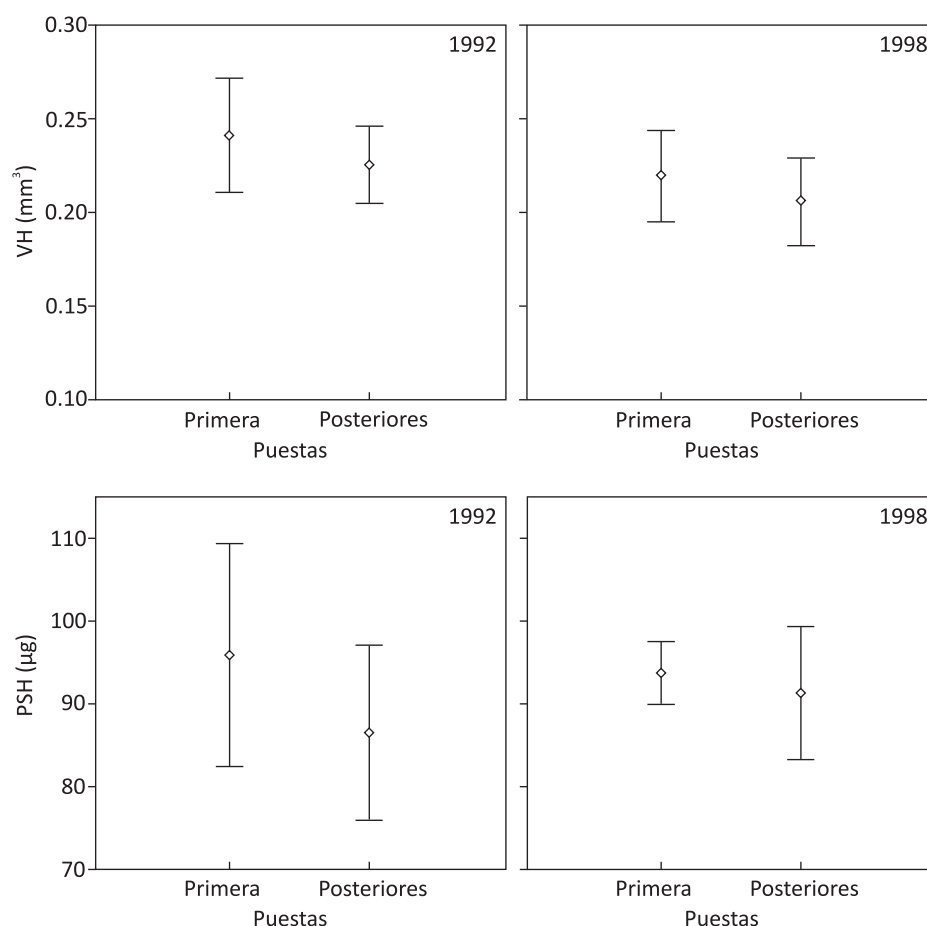


Fig. 3.7. Volumen (mm³, VH) y peso seco (µg, PSH) medios de los huevos de la primera y posteriores puestas de *Maja brachydactyla* correspondiente a los ciclos de cría de 1992 y 1998.

3.3.5. Variaciones estacionales en el tamaño de las puestas

Dentro de un mismo ciclo de cría anual se han observado diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) en el número de huevos, en el peso seco de la puesta y en el volumen medio aunque no en el peso seco medio por huevo.

En lo que se refiere a la fecundidad, los datos mensuales obtenidos durante el periodo 12/1991-09/1992 muestran que las puestas de los primeros meses del ciclo de cría están constituidas por un número pequeño de huevos (186179 ± 27804 huevos), con un valor mínimo: 134739 huevos en diciembre, que se va incrementando a medida que avanza el ciclo. En general, en los meses de primavera y verano las puestas están constituidas por un número medio de huevos similar y mayor que en invierno (281389 ± 45811 huevos), alcanzándose el valor máximo en el mes de mayo (381868 huevos). En los dos ciclos de cría estudiados se observó la misma tendencia, siendo el número medio de huevos que integra la primera puesta (diciembre a marzo) significativamente inferior (ANOVA, $p < 0.05$) al número medio de huevos de las puestas posteriores (mayo a septiembre).

Al igual que en la fecundidad, el peso seco de la puesta se incrementa paulatinamente a lo largo del ciclo de cría, siendo en los meses de invierno ($18.8 \text{ g} \pm 2.5 \text{ g}$) donde se observaron los valores mínimos de peso seco de la puesta (15.0 g en febrero). Por término medio en los dos ciclos estudiados las puestas posteriores fueron significativamente (ANOVA, $p < 0.05$) más pesadas que la primera, con un incremento del 17.7% en 1992 y del 12.0% en el 1998.

En cuanto a las características biométricas de los huevos, en términos de volumen y peso, se observó que los huevos de la primera puesta son de mayor tamaño, tanto en el ciclo de cría correspondiente al 1992 como al 1998, aunque las diferencias observadas solo fueron significativas (ANOVA, $p < 0.05$) en el peso seco del huevo del año 1992 (primera puesta: $95.9 \pm 14.2 \text{ } \mu\text{g}$ y puestas posteriores: $86.5 \pm 11.2 \text{ } \mu\text{g}$).

Los valores de fecundidad y peso seco medio de los huevos de la primera y de las posteriores puestas indican que la centolla, *M. brachydactyla*, presenta diferentes estrategias reproductivas en ambos periodos de puesta. En la figura 3.8a, correspondiente al ciclo de cría de 1992, se representan las distintas combinaciones posibles de número de huevos y peso medio por huevo correspondiente al peso total observado en cada una de las puestas, así como los datos obtenidos de ambas variables. Como se puede observar en dicha figura, la primera puesta presenta un peso seco menor y está constituida por un número menor de huevos que las posteriores puestas pero éstos son de mayor tamaño individual que los huevos que constituyen las posteriores puestas. En la figura 3.8b, correspondiente al ciclo de cría de 1998, si bien las diferencias son menores y existe un mayor solapamiento entre las combinaciones de número de huevos y peso medio por huevo de la primera y las posteriores puestas, la tendencia comentada anteriormente se mantiene.

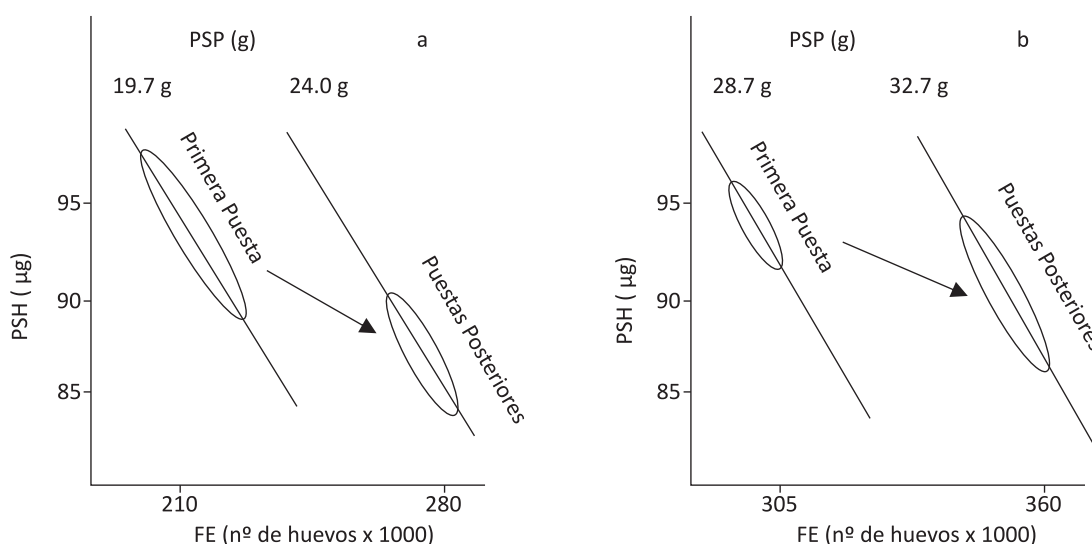


Fig. 3.8. Estrategia reproductiva de *M. brachydactyla* en diferentes puestas de los ciclos de cría correspondientes a 1992 (izquierda) y a 1998 (derecha). Se representan mediante isolíneas las distintas combinaciones potenciales de peso seco medio por huevo (μg , PSH) y de fecundidad (número de huevos, FE) que se ajustan al peso seco de la puesta observado (g, PSP) y, mediante elipses, se muestran aquellas combinaciones realmente observadas, tanto para la primera puesta como para las puestas posteriores de cada ciclo de cría.

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1. Características generales de las puestas

La fecundidad presenta una alta variabilidad entre las familias de crustáceos braquiuros, desde menos de 1000 huevos de *Mithraculus fórcaps* (Cobo & Okamori, 2008) hasta más de 4000000 huevos para *Chionoecetes opilio* (Haynes *et al.*, 1976). Esta variabilidad puede ser atribuida a factores ambientales como la temperatura, la disponibilidad de alimento (Sastri, 1983) o el área geográfica (Otto *et al.*, 1989; Tuck *et al.*, 2000) y a factores biológicos como la talla corporal (Hines, 1982), el tiempo transcurrido desde la última muda o las sucesivas puestas (Sainte-Marie, 1993). Asimismo, las estimas de la fecundidad también están influenciadas por factores como el estado de desarrollo embrionario de los huevos (Gardner, 1997; Tuck *et al.*, 2000) o el método de estimación empleado (Tuck *et al.*, 2000).

Los estudios realizados hasta la actualidad sobre la fecundidad de *M. brachydactyla*, en las diferentes zonas de su distribución (Hartnoll, 1963; Kergariou, 1971, 1975, 1984) indican que es mayor que la de otras especies de la familia Majidae como *Hyas coarctatus* e *Inachus dorsettensis* (Bryant & Hartnoll, 1995), *Libidoclaea granaria* (Schejter & Spivak, 2005) o *Stenocionops ovata* (Villalejo-Fuerte *et al.*, 1999). En la ría de Arousa se han documentado los valores más elevados de fecundidad para esta especie, con puestas de hasta 530309 huevos, en comparación con los valores máximos registrados en anteriores estudios correspondientes a latitudes más altas, que no superaron los 400000 huevos (Kergariou, 1971, 1984; Anónimo, 1993). Al igual que en otros braquiuros, el número de huevos está directamente relacionado con el peso seco de la puesta (Hines, 1991), por lo que los valores de peso seco de las puestas observados en la ría de Arousa son también elevados con respecto a otras zonas, con un máximo de 43.9g.

En este cangrejo el peso de la puesta constituye por término medio un 7.4% del peso corporal de la hembra, siendo menor que el observado en otros májidos de menor tamaño como *Hyas coarctatus* (8.9%) e *Inachus dorsettensis* (9.6%) (Bryant & Hartnoll, 1995), pero próximo al 10% estimado como media de inversión en la producción de huevos para los braquiuros en general (Hines, 1982, 1988, 1991, 1992; Brante *et al.*, 2004). Este porcentaje del peso corporal que corresponde al peso de la puesta, es un buen indicador de la inversión de recursos (energía y componentes tisulares) de la hembra en la producción de huevos (Lardies & Wehrtmann, 1997). Por tanto, los resultados obtenidos indican que independientemente del potencial reproductivo que pueda alcanzar *M. brachydactyla*, no existen diferencias notables en el esfuerzo reproductivo con respecto a otros braquiuros.

En cuanto al tamaño de los huevos, las especies de la familia Majidae se caracterizan por poner huevos de gran tamaño en comparación con las demás familias de braquiuros (Hines, 1982, 1986; Bryant & Hartnoll, 1995). Dentro de esta familia, *M. brachydactyla* es una de las especies con huevos de mayor tamaño y además en la ría de Arousa el tamaño de los huevos es superior al observado en sus congéneres de otras zonas (Kergariou, 1971). Estas variaciones espaciales en el tamaño del huevo, también observadas en otras especies de braquiuros (Brante *et al.*, 2003, 2004), pueden estar relacionadas con variaciones de la temperatura (Jones & Simons, 1983), con la profundidad (Thessalou-Legaki, 1992) o con la producción de puestas sucesivas (Sainte-Marie, 1993; Gardner, 1997) como se ha demostrado también en este estudio.

3.4.2. Variaciones en la puesta con la talla corporal de las hembras

Como en otros crustáceos decápodos braquiuros, tanto la fecundidad como el peso seco de las puestas de *M. brachydactyla* están directamente relacionados con el tamaño corporal de la hembra (p.ej. Hines, 1982, 1988, 1991; Villalejo-Fuerte *et al.*, 1999; Figueiredo *et al.*, 2008a). Cuanto mayor sea el tamaño de la hembra, mayor será también la cantidad total de recursos (energía y componentes estructurales) que podrá invertir en los procesos de maduración gonadal y de acumulación del vitelo en el interior de los óvulos, y mayor será el espacio corporal disponible para la puesta. En el caso de *M. brachydactyla*, el incremento de la fecundidad y el peso de la puesta con el tamaño de las hembras varía dependiendo tanto de la condición interna del animal (reservas de lípidos y proteínas, fundamentalmente) como de parámetros ambientales relacionados con el hábitat y la época del año, como son la disponibilidad de alimento y la temperatura, tal y como se ha constatado en otros decápodos (Rabalais, 1991; Mori *et al.*, 2001).

Si bien se ha constatado en algunos decápodos la existencia de correlación entre el tamaño del huevo y la talla corporal (Attard & Hudon, 1987), en *M. brachydactyla*, al igual que en otros májidos como *Chionoecetes opilio* y *Chionoecetes bairdi* (Haynes *et al.*, 1976), *Inachus dorsettensis* y *Hyas coarctatus* (Bryant & Hartnoll, 1995) no se observó ninguna correlación con la talla corporal de la hembra.

3.4.3. Variaciones temporales (interanuales y espaciales) en las puestas

Las variaciones interanuales observadas en las características de las puestas de esta especie en la ría de Arousa afectan fundamentalmente al número de huevos que las constituyen y a su peso seco total. Las puestas correspondientes a 1992 han sido claramente inferiores a las de 1998, tanto en fecundidad como en peso seco de la puesta, lo cual podría ser debido a que en el primer ciclo de cría estudiado se incluyen hembras ovígeras correspondientes a los primeros meses del ciclo (diciembre a febrero), cuando las temperaturas son más bajas y hay menos alimento disponible. Además de ello, ha transcurrido menos tiempo desde la muda terminal y la migración reproductiva, lo cual podría influir en la condición interna de la hembra y, por tanto, de su puesta. Las diferencias interanuales observadas en las puestas posteriores a la primera puesta podrían ser debidas fundamentalmente a las diferencias en las condiciones ambientales en ambos ciclos.

Las variaciones entre épocas reproductivas observadas en las puestas de este cangrejo en la ría de Arousa y en otros májidos como *Chionoecetes bairdi* (Somerton & Meyers, 1983), *Chionoecetes opilio* (Sainte Marie, 1993) o *Inachus dorsettensis* (Bryant & Hartnoll, 1995), pueden ser también debidas a las causas anteriormente descritas. Así, la primera puesta de *M. brachydactyla*, que presenta los valores más bajos de fecundidad y peso seco, se realiza en invierno, cuando las condiciones ambientales no son favorables y las hembras todavía no tienen en su organismo reservas suficientes para invertir en la reproducción, ya que se están recuperando de la inversión energética realizada durante la muda terminal y la migración reproductiva (González-Gurriarán *et al.*, 1995, 2002; Sampedro *et al.*, 2003). En cambio las puestas posteriores, cuando los valores son más elevados, se realizan en primavera y verano, en condiciones ambientales más favorables (hay mayor disponibilidad de alimento y temperaturas superiores que incrementan la actividad de los animales), pudiendo disponer las hembras de más recursos para la reproducción.

El mayor porcentaje del peso de la puesta respecto al peso corporal de la hembra en las puestas posteriores (8.2% en 1992 y 7.0% en 1998) que en las primeras puestas (7.9% en 1992 y 6.1% en 1998) para los dos ciclos de cría estudiados, indica una mayor inversión de recursos (energía y componentes tisulares) de la hembra en la producción de huevos.

En cuanto al tamaño del huevo, las variaciones entre estaciones reproductivas observadas en las puestas de *M. brachydactyla*, así como en otros braquiuros como *Callinectes sapidus* (Amsler & George, 1984) o májidos como *Chionoecetes opilio* (Sainte Marie, 1993), están probablemente determinadas por los cambios en las condiciones ambientales, como la disponibilidad de alimento o la temperatura (Clarke, 1993a y b). En las primeras puestas del ciclo de cría, el tamaño de los huevos es grande y por tanto, contienen mayor cantidad de vitelo, lo que indica una inversión considerable por parte de la hembra en cada embrión (Clarke, 1993a), de manera que tras la eclosión las larvas tendrán una mayor probabilidad de supervivencia en las condiciones adversas. Por el contrario, en las puestas posteriores del ciclo de cría, el tamaño del huevo es menor, lo que indica una menor inversión parental en cada embrión. Aunque los embriones tienen menos reservas nutricionales para el desarrollo, las condiciones del medio son más favorables, especialmente porque cuentan con más alimento disponible.

Las variaciones en las características de las sucesivas puestas de un mismo ciclo de cría de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa reflejan la existencia de dos estrategias reproductivas que se diferencian entre sí por la utilización de los recursos estructurales y energéticos en producir pocos huevos de gran tamaño, o bien, muchos huevos de pequeño tamaño, dependiendo de las condiciones ambientales. Estas variaciones en el tamaño y la cantidad de los huevos fecundados de las puestas en función de las condiciones ambientales, han sido señaladas en anteriores ocasiones para otros crustáceos (Hines, 1992), y la relación inversa observada entre estas dos variables en las puestas de *M. brachydactyla*, se ha constatado también en otras especies de braquiuros como *Armases cinereum* (Figueiredo *et al.*, 2008a).

4

**VARIACIONES TEMPORALES Y ESPACIALES EN
LA CALIDAD DE LAS PUESTAS DE LA CENTOLLA,
M. BRACHYDACTYLA (DECAPODA:MAJIDAE)**

4.1. INTRODUCCIÓN

Las especies con una amplio rango de distribución geográfica y un extenso periodo de cría, como *Maja brachydactyla*, están sometidas a cambios temporales y espaciales en las condiciones ambientales que influyen en las primeras fases de su ciclo de vida (Brante *et al.*, 2003; Rotllant *et al.*, 2004). Estas especies pueden experimentar variaciones en la disponibilidad de alimento, temperatura o salinidad, que pueden provocar diferencias intra e interespecíficas en el condición energética de los embriones y las larvas recién eclosionadas (p. ej.: Kunisch & Anger, 1984; Tuck *et al.*, 2000; Brante *et al.*, 2003; Giménez & Anger, 2003; Verísimo *et al.*, 2011).

En crustáceos decápodos se han observado variaciones intraespecíficas estacionales (Boddeke, 1982; Pond *et al.*, 1996; Calado *et al.*, 2005; Bas *et al.*, 2007), interanuales (Kattner *et al.*, 1994; Ouellet & Plante, 2004), latitudinales y batimétricas (p. ej.: Kyomo, 2000; Lardies & Castilla, 2001; Brante *et al.*, 2004; Thatje *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2007; Fischer & Thatje, 2008; Ellis *et al.*, 2015) en numerosos parámetros reproductivos, desde la fecundidad (p. ej.: Díaz, 1980; Bas *et al.*, 2007) hasta la composición bioquímica de los embriones (Amsler & George, 1984; Wehrtmann & Kattner, 1998; Jacobs *et al.*, 2003; Bas *et al.*, 2007), y como consecuencia, en la condición fisiológica de los estadios larvarios iniciales (Ouellet & Allard, 2002; Paschke *et al.*, 2004; Gebauer *et al.*, 2010). El tamaño y calidad de los embriones y las larvas recién eclosionadas puede también afectar al desarrollo de las subsiguientes fases del ciclo de vida (Giménez *et al.*, 2004; Giménez, 2006, 2010; Pechenik, 2006; Harrison *et al.*, 2011). Todo ello puede ser relevante para la ecología (Underwood & Keough, 2001; Pan *et al.*, 2011), la acuicultura (Arcos *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2010a) o la gestión pesquera de los crustáceos (Botsford, 1991; Fischer *et al.*, 2009).

Esta variabilidad en las condiciones ambientales, tanto a nivel biótico (disponibilidad y calidad del alimento, presencia de predadores) como abiótico (temperatura, salinidad, fotoperiodo) (Bas *et al.*, 2007; Giménez, 2010; Rotllant *et al.*, 2013a) unido al tipo de crecimiento (continuo o determinado) de cada especie puede tener una gran influencia sobre el estado nutricional de las hembras. Este estado nutricional determina la inversión maternal, ya que las reservas del huevo provienen fundamentalmente de la dieta de las hembras previa a la ovogénesis (Racotta *et al.*, 2003).

Por otro lado, la estrecha dependencia de las condiciones ambientales y de su variabilidad espacial y temporal puede motivar la aparición de diferentes estrategias reproductivas en crustáceos. Una de las cuestiones clave se basa en la inversión de energía hacia puestas constituidas por un número elevado de huevos de pequeño tamaño, o bien, hacia puestas constituidas por un número menor de huevos con un mayor tamaño individual (Stearns, 1992; Moran & McAlister, 2009; Urzúa *et al.*, 2012). Los huevos grandes se desarrollan más lentamente (Steele & Steele, 1975) y dan lugar a larvas más desarrolladas y más grandes (Clarke, 1993a; Jaliha *et al.*, 1993; Murphy & Austin, 2005). En general, la producción de huevos grandes refleja una mayor inversión de energía por huevo a costa de reducir la fecundidad (Smith & Fretwell, 1974). Este rasgo reproductivo es a menudo interpretado como una adaptación evolutiva a cambios estacionales en la disponibilidad de alimento planctónico y al prolongado desarrollo larvario provocado por las bajas temperaturas (p. ej.: Anger *et al.*, 2003; Kattner *et al.*, 2003; Thatje *et al.*, 2004; Marshall *et al.*, 2008).

Las puestas tienen un papel fundamental en la historia de vida de los invertebrados marinos, ya que los huevos que las constituyen deben contener todos los nutrientes necesarios para el mantenimiento y desarrollo de un embrión, por tanto la calidad y cantidad de estos nutrientes puede determinar la calidad

y supervivencia de las larvas (Anger, 1998; Rosa *et al.*, 2007). Aunque las proteínas son el principal constituyente de los huevos (Holland, 1978; Pond *et al.*, 1996), los lípidos son los que proporcionan al menos el 60% de la energía necesaria durante el desarrollo embrionario en crustáceos (Herring, 1974; Holland, 1978; Amsler & George, 1984). Los lípidos son empleados como componentes estructurales de las membranas celulares (Arts *et al.*, 2001), manteniendo la fluidez de la membrana bajo condiciones variables de temperatura (Cossins *et al.*, 1997). Además, el contenido de los diferentes componentes bioquímicos y en particular, el contenido en ácidos grasos esenciales, que no pueden ser sintetizados de novo (Kanazawa *et al.*, 1979a y b; Mourente, 1996), y su variabilidad en los huevos proveen información sobre los rasgos de vida de los crustáceos, su hábitat y la composición de su dieta (Rosa *et al.*, 2007).

Maja brachydactyla es uno de los crustáceos decápodos más importantes a nivel socioeconómico en Europa y está sometida a una intensa actividad pesquera a lo largo del Atlántico Nordeste (FAO, 2012), siendo constatada la presencia de signos de sobreexplotación en algunos de sus stocks (Freire *et al.*, 2002). Esta especie presenta un periodo reproductivo con una variabilidad espacial relacionada con las características ambientales propias de las diferentes latitudes donde vive (Kergariou, 1975; Brosnan, 1981; Rodhouse, 1984; García-Flórez & Fernández-Rueda, 2000). El número de puestas que produce anualmente también varía en función de la latitud, desde una única puesta anual (Carlisle, 1957; Hartnoll, 1965; Edwards, 1979; Brosnan, 1981; Rodhouse, 1984; Fahy, 2001) hasta dos puestas (Martin, 1983; Kergariou, 1984). En Galicia presenta un ciclo reproductivo anual (desde diciembre a noviembre) con una elevada fecundidad (Verísimo *et al.*, 2011) y con capacidad para producir al menos tres puestas consecutivas (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998). Durante este extenso periodo reproductivo, se ha constatado que la centolla puede presentar dos estrategias reproductivas (Verísimo *et al.*, 2011). En las primeras puestas, que se realizan en invierno bajo condiciones ambientales desfavorables, produce pocos huevos de gran tamaño, mientras que en las puestas posteriores, que tienen lugar en primavera-verano, con condiciones ambientales favorables, presentan un mayor número de huevos de menor tamaño. Este mismo patrón se ha observado en otros majoideos como *Chionoecetes opilio* (Sainte-Marie, 1993) o *Inachus dorsettensis* (Bryant & Hartnoll, 1995), así como en otros crustáceos decápodos como *Callinectes sapidus* (Amsler & George, 1984) o *Crangon crangon* (Boddeke, 1982).

En la actualidad hay una gran falta de información sobre la variabilidad temporal de las puestas de esta especie, más allá de los proyectos tradicionales de estudio de la sobreexplotación. Es por ello que este estudio tiene como objetivo caracterizar las estrategias reproductivas de *Maja brachydactyla* en base a la composición bioquímica y la condición energética de sus puestas. Dado que los organismos tienden a conseguir una composición bioquímica óptima (dependiendo de las condiciones ambientales), los niveles de componentes bioquímicos como los lípidos, las proteínas, los carbohidratos o incluso la composición de ácidos grasos en cada puesta puede ser una expresión de las características adaptativas del animal. Factores bióticos, como la disponibilidad de alimento o abióticos, como la temperatura pueden tener un importante efecto sobre la fisiología y bioquímica de los crustáceos decápodos y, en consecuencia, sobre la inversión energética a lo largo del ciclo de cría. Por todo, la composición bioquímica (composición básica, composición bioquímica, clases de lípidos, composición de ácidos grasos y ácidos nucleicos) de los huevos recién desovados de *M. brachydactyla* ha sido estudiada a nivel estacional (primera puesta o puestas posteriores), interanual (ciclo de cría de 1998, 1999 y 2003) y espacial (ría de Arousa, ría de A Coruña). La existencia de variaciones temporales o espaciales en cuanto a la calidad de las puestas debería ser tomada en cuenta para la gestión de los stocks, dado que es un factor clave para la sostenibilidad de las poblaciones naturales explotadas, así como, para la potencial explotación en acuicultura.

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Muestreo

Hembras ovígeras de *M. brachydactyla* fueron capturadas en dos zonas geográficas de Galicia, la ría de Arousa y la ría de A Coruña (NW, España), en tres ciclos anuales diferentes (1998 y 1999 en Arousa, y 1999 y 2003 en Coruña) y en dos épocas del año distintas, en invierno (febrero-marzo), momento en el que las hembras se encuentran realizando la primera puesta, y en primavera (mayo-junio), cuando están desarrollando las puestas posteriores (segunda y tercera puesta). Solamente se recolectaron aquellas hembras cuyos abdómenes presentan puestas con huevos de color naranja claro, que se correspondían con la clasificación macroscópica de González-Gurriarán *et al.* (1993), de estado I (la información sobre el método de muestreo y la zona de pesca puede ser consultada en el apartado de “Área de Estudio” dentro de “Metodología general”, página 15).

En total se seleccionaron 55 hembras ovígeras, 31 en 1998 (13 en 1ª puesta y 18 en 2ª puesta) y 24 en 1999 (13 en 1ª puesta y 11 en 2ª puesta) de la ría de Arousa y 62 hembras ovígeras, 20 en 1999 (11 en 1ª puesta y 9 en 2ª puesta) y 42 en 2003 (19 en 1ª puesta y 23 en 2ª puesta) de la ría de La Coruña.

4.2.2. Preparación de las muestras

A continuación, las hembras fueron trasladadas al laboratorio en neveras portátiles a baja temperatura y con paños humedecidos en agua de mar. Una vez en el laboratorio, se caracterizó la biometría de los ejemplares siguiendo la metodología descrita en el apartado “Preparación de las Muestras” dentro del capítulo de “Metodología General” (página 21).

Durante la extracción de las puestas se recogieron submuestras para la determinación del estado inicial de desarrollo del huevo. Para ello, una submuestra de 10 huevos de cada puesta fue analizada mediante un estereomicroscopio Nikon SMZ 1500 para constatar que los huevos se encontraban en una fase inicial de desarrollo (recién desovados) ya que el estado I, descrito previamente (González-Gurriarán *et al.*, 1993) cubre un amplio periodo de tiempo dentro del desarrollo embrionario. Se seleccionaron solamente aquellas hembras en cuyas puestas se observó la inexistencia de cualquier tipo de estructura anatómica desarrollada o presencia de embrión.

Una vez seleccionadas las puestas recién desovadas se recogieron submuestras de huevos para su caracterización biométrica y para los análisis bioquímicos de las puestas, siguiendo lo descrito en el apartado “Preparación de las Muestras” dentro de “Metodología General” (página 21).

4.2.3. Análisis bioquímicos

Sobre las muestras liofilizadas se realizaron una serie de análisis del contenido en: agua, cenizas, materia orgánica, carbono y nitrógeno (mediante un análisis elemental), lípidos (método de Bligh & Dyer, 1959), fracciones lipídicas (Sukenik *et al.*, 1989), ácidos grasos (Lepage & Roy, 1984), carbohidratos (método de Dubois *et al.*, 1956), ácidos nucleicos (método de Clemmesen, 1993 y Mokness *et al.*, 2000) y energía (energía^s, Salonen *et al.*, 1976 y energía^w, Winberg, 1971). A partir del nitrógeno se estimó el contenido proteico mediante un factor de conversión del nitrógeno (Gnaiger & Bitterlich, 1984). Todos los análisis bioquímicos se realizaron por triplicado, exceptuando los de composición elemental (carbono y nitrógeno) y los de composición de ácidos grasos. En este caso, solo se hicieron réplicas en caso de discrepancias significativas entre muestras. Las técnicas analíticas se detallan en el apartado “Técnicas Analíticas” dentro de “Metodología General” (página 27).

4.2.4. Análisis estadísticos

La variabilidad estacional e interanual de la composición de los huevos, tanto en mg de tejido como por huevo individual, fue evaluada mediante una ANOVA de dos vías con interacción entre los factores. Se incluyó la interacción para comprobar si el cambio en el nivel de uno de los factores depende de los niveles del otro factor. La variable respuesta fue cada una de las variables de estudio (diámetro medio, volumen, peso seco del huevo, agua, materia orgánica, cenizas, carbono, relación C/N, lípidos, proteínas, carbohidratos, relación lip/prot, energía^s, energía^w). Los factores fueron la puesta (con dos niveles: primera y posteriores puestas) y el ciclo de cría (con dos niveles: 1998/1999 en la ría de Arousa o 1999/2003 en la ría de A Coruña) ($Y = Puesta + Año + Puesta : Año$). Después del análisis los casos donde las diferencias fueron significativas se evaluaron mediante un test a posteriori, seleccionándose el test de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey-Kramer, debido a que no es tan conservador como el test de Bonferroni, ni tan permisivo como el DMS (Diferencia Mínima Significativa), dado que su región crítica, es respectivamente mayor y menor que en dichos tests.

La variabilidad espacial de la composición biométrica y bioquímica de los huevos, tanto en mg de tejido como por huevo individual, fue testada con una ANOVA de dos vías con interacción entre los factores, teniendo como variable respuesta cada una de las variables de estudio (diámetro medio, volumen, peso seco del huevo, agua, materia orgánica, cenizas, carbono, relación C/N, lípidos, proteínas, carbohidratos, relación lip/prot, energía^s, energía^w) y como factores la puesta (con dos niveles: primera y posteriores puestas) y la zona geográfica (con dos niveles: ría de Arousa y ría de A Coruña) ($Y = Puesta + Zona + Puesta : Zona$). Los datos utilizados en los análisis proceden del ciclo de cría de 1999 para eliminar la posible variabilidad debida al factor año. Los casos donde las diferencias fueron significativas se analizaron mediante el test a posteriori de Tukey-Kramer.

La variabilidad estacional de las clases de lípidos, ácidos grasos y ácidos nucleicos se analizó mediante una ANOVA de una vía, teniendo como variables respuesta cada una de las variables de estudio y como factor la puesta (con dos niveles: primera y posteriores puestas). Los datos utilizados en los análisis proceden de un ciclo de cría de cada una de las zonas de estudio (1998 para la ría de Arousa y 2003 para la ría de A Coruña). Los casos donde las diferencias fueron significativas se analizaron mediante el test a posteriori de Tukey-Kramer.

Todos los datos de las variables de estudio fueron presentados como promedio y su desviación estándar o típica (media \pm desviación estándar) a lo largo de la descripción de los resultados de este capítulo.

4.3. RESULTADOS

La talla de las hembras empleadas en este capítulo no presentó relación significativa con la mayoría de las variables de este estudio (Anexo, Tabla 1.1). Los escasos casos donde se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$), presentaban una correlación baja ($r^2 < 0.13$), como en el caso de los glucolípidos de la ría de Arousa, cuyas diferencias podrían ser debidas a la dispersión de los valores de glucolípidos entre tallas. A continuación se muestra la distribución de tallas en cada ciclo reproductivo de cada zona de estudio así como los valores medios de las tallas de las hembras (Fig.4.1, Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Tallas de las hembras (longitud de cefalotórax, mm) de *M. brachydactyla* de los ciclos de cría de 1998 y 1999 de la ría de Arousa y de los ciclos de cría de 1999 y 2003 de la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar (DE) y el número de hembras (N).

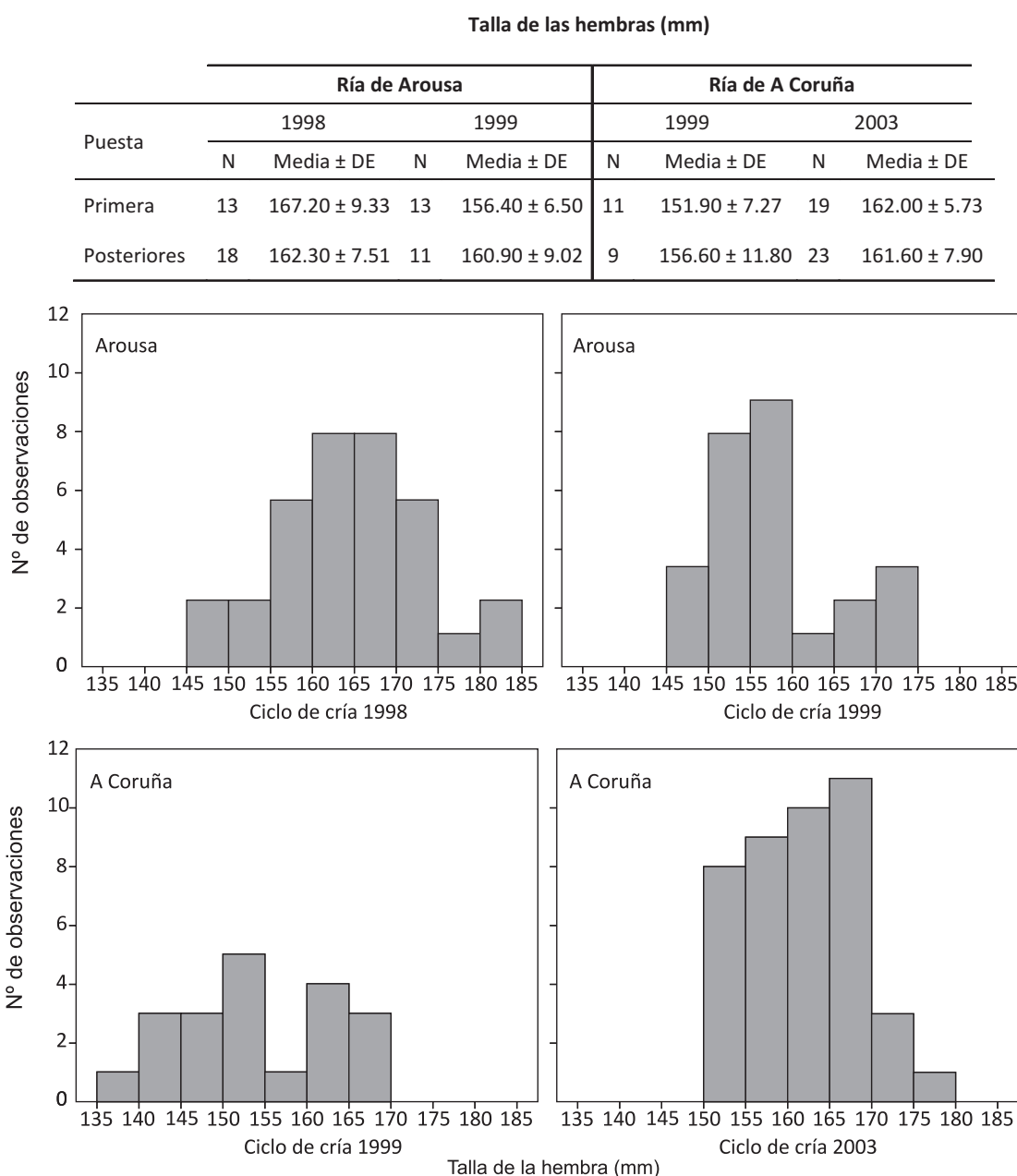


Fig. 4.1. Histograma de frecuencias de tallas de las hembras usadas en este estudio en la ría de Arousa en el ciclo de 1998 (arriba, izquierda) y en el de 1999 (arriba, derecha) y en la ría de A Coruña en el ciclo de 1999 (abajo, izquierda) y en el de 2003 (abajo, derecha).

4.3.1. Características biométricas del embrión.

El tamaño de los huevos recién desovados, medido como diámetro medio (DMH) o como volumen (V), mostró diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre puestas, siendo mayor el tamaño del huevo en las primeras puestas del ciclo, tanto para la ría de Arousa (DMH: $714.1 \pm 8.6 \mu\text{m}$ (1998), $715.2 \pm 10.0 \mu\text{m}$ (1999) y V: $0.202 \pm 0.007 \text{ mm}^3$ (1998), $0.201 \pm 0.008 \text{ mm}^3$ (1999)) como para la ría de A Coruña (DMH: $708.2 \pm 4.9 \mu\text{m}$ (1999), $709.5 \pm 6.5 \mu\text{m}$ (2003) y V: $0.199 \pm 0.005 \text{ mm}^3$ (1999), $0.199 \pm 0.006 \text{ mm}^3$ (2003)) (Fig. 4.2, Tablas 4.2 y 4.3).

También, el peso seco por huevo fue más elevado en las primeras puestas (ANOVA, $p < 0.001$), con una diferencia de pesos entre puestas de 3.6% (1998) y 5.2% (1999) en la ría de Arousa y 5.3% (1999) y 5.2% (2003) en la ría de A Coruña (Fig. 4.2, Tablas 4.2 y 4.3).

En la comparación entre zonas geográficas del año 1999 se apreció que los huevos de la ría de Arousa ($706.9 \pm 12.3 \mu\text{m}$) fueron ligeramente superiores en diámetro medio que los de la ría de A Coruña ($702.0 \pm 9.2 \mu\text{m}$) (ANOVA, $p < 0.05$), mientras que en el volumen y en el peso seco por huevo no se observaron diferencias espaciales significativas (Tabla 4.4).

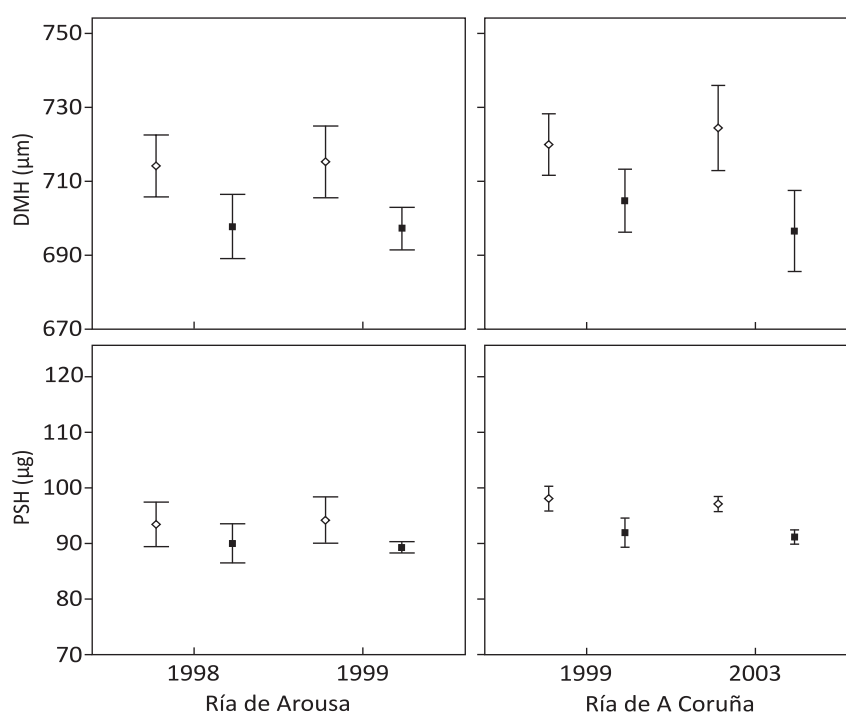


Fig. 4.2. Cambios en el diámetro medio (DMH, arriba) y en el peso seco del huevo (PSH, abajo) entre puestas (1ª, rombo y posteriores, cuadrado) y entre ciclos de cría (1998/1999 o 1999/2003) en la ría de Arousa (izquierda) y en la ría de A Coruña (derecha). Los valores representados son la media y la desviación estándar.

Tabla 4.2. Variaciones interanuales y estacionales en las características biométricas (diámetro medio (DMH), volumen (V) y peso seco (PSH)) del huevo recién desovado de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Ría de Arousa | | | | |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Parámetros | 1998 | | 1999 | |
| | 1ª Puesta | Puestas posteriores | 1ª Puesta | Puestas posteriores |
| DMH (μm) | 714.14 \pm 8.60 ^a | 697.80 \pm 8.82 ^b | 715.25 \pm 10.01 ^a | 697.21 \pm 5.82 ^b |
| V (mm^3) | 0.202 \pm 0.007 ^a | 0.187 \pm 0.009 ^b | 0.201 \pm 0.008 ^a | 0.186 \pm 0.007 ^b |
| PSH (μg) | 93.45 \pm 4.07 ^{ab} | 90.04 \pm 3.56 ^{bc} | 94.23 \pm 4.23 ^a | 89.36 \pm 0.91 ^c |

| Ría de A Coruña | | | | |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Parámetros | 1999 | | 2003 | |
| | 1ª Puesta | Puestas posteriores | 1ª Puesta | Puestas posteriores |
| DMH (μm) | 708.18 \pm 4.92 ^a | 694.47 \pm 7.42 ^b | 709.49 \pm 6.53 ^a | 692.09 \pm 9.60 ^b |
| V (mm^3) | 0.199 \pm 0.005 ^a | 0.183 \pm 0.008 ^b | 0.199 \pm 0.006 ^a | 0.181 \pm 0.009 ^b |
| PSH (μg) | 92.71 \pm 1.88 ^a | 87.76 \pm 2.22 ^b | 91.92 \pm 1.15 ^a | 87.12 \pm 1.07 ^b |

Tabla 4.3. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en las características del huevo recién desovado (diámetro medio (DMH), volumen del huevo (V) y peso seco del huevo (PSH)) entre puestas (1ª o posteriores) y ciclos de cría (1998/1999 o 1999/2003) en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Ría de Arousa | | | | | | Ría de A Coruña | | | |
|-----------------------|--------------|----|----------|-------|--------|-----------------|---------|--------|--------|
| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P | gl | MC | F | P |
| V (mm^3) | Puesta | 1 | 0.002931 | 48.76 | <0.001 | 1 | 0.00453 | 85.16 | <0.001 |
| | Año | 1 | 0.000002 | 0.025 | 0.88 | 1 | 0.00001 | 0.15 | 0.70 |
| | Puesta x Año | 1 | 0.000001 | 0.002 | 0.96 | 1 | 0.00001 | 0.16 | 0.69 |
| | Error | 51 | 0.000060 | | | 58 | 0.00005 | | |
| DMH (μm) | Puesta | 1 | 4019 | 54.66 | <0.001 | 1 | 4088 | 68.16 | <0.001 |
| | Año | 1 | 1 | 0.01 | 0.92 | 1 | 3 | 0.05 | 0.83 |
| | Puesta x Año | 1 | 10 | 0.13 | 0.72 | 1 | 45 | 0.76 | 0.39 |
| | Error | 51 | 74 | | | 58 | 60 | | |
| PSH (μg) | Puesta | 1 | 226.56 | 18.16 | <0.001 | 1 | 373.20 | 175.24 | <0.001 |
| | Año | 1 | 0.00 | 0.00 | 0.98 | 1 | 6.90 | 3.25 | 0.08 |
| | Puesta x Año | 1 | 7.35 | 0.59 | 0.45 | 1 | 0.10 | 0.04 | 0.85 |
| | Error | 51 | 12.47 | | | 58 | 2.10 | | |

Tabla 4.4. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en las características del huevo recién desovado (diámetro medio (DMH), volumen del huevo (V) y peso seco del huevo (PSH) entre puestas (1ª o posteriores) y zonas geográficas (ría de Arousa/ría A Coruña) dentro del ciclo de cría de 1999. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|----------------------|---------------|----|----------|-------|--------|
| V (mm ³) | Puesta | 1 | 0.002548 | 52.90 | <0.001 |
| | Zona | 1 | 0.000101 | 2.09 | 0.16 |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.000004 | 0.08 | 0.78 |
| | Error | 40 | 0.000048 | | |
| DMH (µm) | Puesta | 1 | 2806 | 50.48 | <0.001 |
| | Zona | 1 | 284 | 5.11 | <0.05 |
| | Puesta x Zona | 1 | 51 | 0.91 | 0.35 |
| | Error | 40 | 56 | | |
| PSH (µg) | Puesta | 1 | 262.55 | 35.32 | <0.001 |
| | Zona | 1 | 25.89 | 3.48 | 0.07 |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.01 | 0.00 | 0.97 |
| | Error | 40 | 7.43 | | |

4.3.2. Composición básica de la puesta

El contenido de agua, tanto en tejido (µg/mg PH) como por huevo, no presentó diferencias significativas entre puestas, excepto en el contenido en agua por huevo en la ría de Arousa (Fig. 4.3, Tablas 4.5 y 4.6). En este caso se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) entre puesta, con un valor ligeramente superior del agua por huevo en las primeras puestas (57.6 ± 2.53 µg/mg PH). En cambio, en el contenido en materia orgánica si se observaron diferencias significativas entre puestas, tanto en tejido (ANOVA, $p < 0.05$) como por huevo (ANOVA, $p < 0.001$), en las dos zonas de estudio. Así, el contenido en materia orgánica fue superior en las primeras puestas del ciclo de cría, con valores medios de 361.9 ± 4.03 µg/mg PH y de 33.9 ± 1.48 µg/huevo en la ría de Arousa y de 361.9 ± 2.44 µg/mg PH y de 33.4 ± 0.58 µg/huevo en la ría de A Coruña.

Las cenizas también mostraron diferencias significativas entre puesta pero con un patrón contrario entre las dos rías (Figs. 4.3 y 4.4, Tablas 4.5 y 4.6). En la ría de Arousa las diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) se observaron en el contenido de cenizas por mg de tejido, con valores ligeramente superiores en las puestas posteriores (25.28 ± 1.82 µg/mg PH), mientras que en la ría de A Coruña, las diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.01$) se apreciaron en el contenido de cenizas por huevo, siendo superior en las primeras puestas (2.27 ± 0.13 µg/huevo). No se apreciaron diferencias significativas interanuales ni en la interacción puesta-año para ninguna de las tres variables en las dos zonas de estudio.

A nivel espacial, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las tres variables (tanto por mg de tejido como por huevo), manteniéndose la misma tendencia entre puestas de mayores valores de materia orgánica en las primeras puestas (Tabla 4.7).

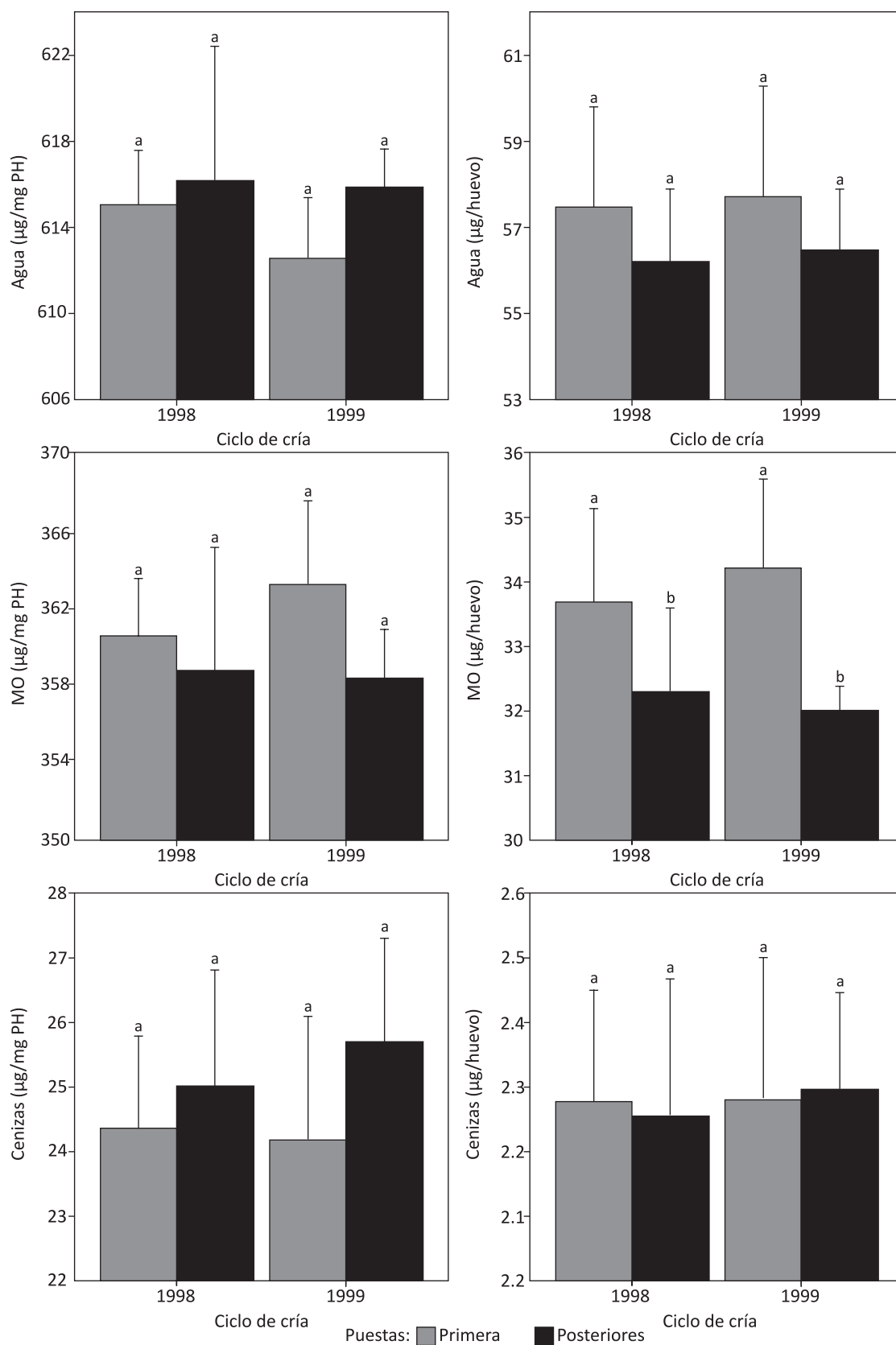


Fig. 4.3. Cambios en el contenido en agua, materia orgánica (MO) y cenizas de las puestas (µg/mg PH) (izquierda) y de los huevos individuales (derecha) para los ciclos de cría (1998 y 1999) de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre las puestas de los dos ciclos de cría (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

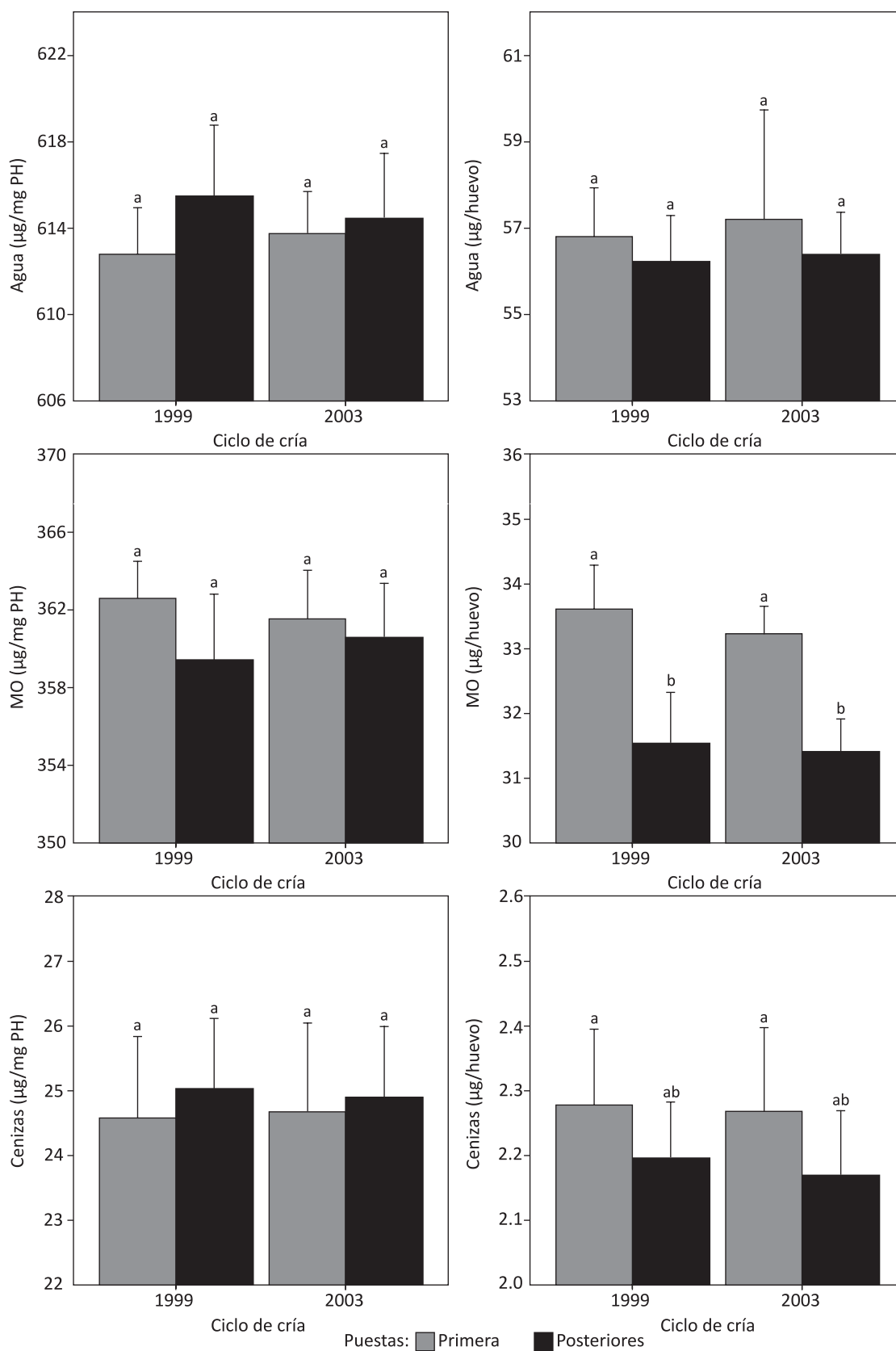


Fig. 4.4. Cambios en el contenido en agua, materia orgánica (MO) y cenizas de las puestas (μg/mg PH) (izquierda) y de los huevos individuales (derecha) para los ciclos de cría (1999 y 2003) de *M. brachydactyla* en la ría de A Coruña. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre las puestas de los dos ciclos de cría (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

Tabla 4.5. Variaciones interanuales y estacionales en el contenido de agua, materia orgánica (MO) y cenizas por mg de tejido (peso húmedo, PH), por porcentaje y por huevo individual recién desovado de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre puestas (1ª o posteriores, test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Parámetros | Ría de Arousa | | | Ría de A Coruña | | |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 1998 | | 1999 | 1999 | | 2003 |
| | 1ª Puesta | Puestas posteriores | 1ª Puesta | Puestas posteriores | 1ª Puesta | Puestas posteriores |
| Agua ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 615.06 \pm 2.68 ^a | 616.20 \pm 6.59 ^a | 612.58 \pm 2.97 ^a | 615.90 \pm 1.86 ^a | 612.82 \pm 2.27 ^a | 613.76 \pm 2.05 ^a |
| MO ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 360.57 \pm 3.12 ^a | 358.78 \pm 6.70 ^a | 363.23 \pm 4.52 ^a | 358.39 \pm 2.64 ^a | 362.60 \pm 2.02 ^a | 361.56 \pm 2.64 ^a |
| Cenizas ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 24.37 \pm 1.51 ^a | 25.03 \pm 1.89 ^a | 24.19 \pm 2.01 ^a | 25.71 \pm 1.69 ^a | 24.58 \pm 1.33 ^a | 24.68 \pm 1.45 ^a |
| Agua ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 57.47 \pm 2.46 ^a | 56.21 \pm 1.77 ^a | 57.73 \pm 2.70 ^a | 56.47 \pm 1.51 ^a | 56.82 \pm 1.19 ^a | 57.22 \pm 2.67 ^a |
| MO ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 33.70 \pm 1.52 ^a | 32.30 \pm 1.37 ^b | 34.22 \pm 1.45 ^a | 32.02 \pm 0.39 ^b | 33.62 \pm 0.71 ^a | 33.24 \pm 0.45 ^a |
| Cenizas ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 2.28 \pm 0.18 ^a | 2.26 \pm 0.22 ^a | 2.28 \pm 0.23 ^a | 2.30 \pm 0.16 ^a | 2.28 \pm 0.12 ^a | 2.27 \pm 0.14 ^a |
| Agua (% PH) | 61.51 \pm 0.26 | 61.62 \pm 0.64 | 61.26 \pm 0.29 | 61.59 \pm 0.18 | 61.28 \pm 0.22 | 61.38 \pm 0.20 |
| MO (% PH) | 36.06 \pm 0.30 | 35.88 \pm 0.65 | 36.32 \pm 0.43 | 35.84 \pm 0.25 | 36.26 \pm 0.19 | 36.16 \pm 0.26 |
| Cenizas (% PH) | 2.44 \pm 0.14 | 2.50 \pm 0.18 | 2.42 \pm 0.19 | 2.57 \pm 0.16 | 2.46 \pm 0.13 | 2.47 \pm 0.14 |

Tabla 4.6. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido en agua, materia orgánica (MO) y cenizas por mg de tejido (peso húmedo, PH) y por huevo individual entre puestas (1ª o posteriores) y ciclos de cría (1998/1999 o 1999/2003) en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| | | Ría de Arousa | | | | | | Ría de A Coruña | | | | | |
|------------|---------------|----------------------|-------|-------|--------------------------|--------|------|----------------------|-------|--------|--------------------------|-------|------|
| Parámetros | Factor | Por huevo (µg/huevo) | | | Por tejido (µg/mg de PS) | | | Por huevo (µg/huevo) | | | Por tejido (µg/mg de PS) | | |
| | | gl | MC | F | P | MC | F | gl | MC | F | P | MC | F |
| Agua | Puesta | 1 | 22.84 | 4.93 | <0.05 | 70.12 | 3.71 | 1 | 7.88 | 2.61 | 0.11 | 28.52 | 3.73 |
| | Zona | 1 | 0.88 | 0.19 | 0.66 | 24.76 | 1.31 | 1 | 1.10 | 0.36 | 0.55 | 0.00 | 0.00 |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.00 | 0.00 | 1.00 | 15.87 | 0.84 | 1 | 0.19 | 0.06 | 0.80 | 13.10 | 1.72 |
| | Error | 51 | 4.64 | | | 18.92 | | 58 | 3.02 | | | 7.64 | |
| MO | Puesta | 1 | 42.66 | 25.13 | <0.001 | 146.35 | 6.25 | 1 | 57.20 | 163.43 | <0.001 | 42.51 | 5.42 |
| | Zona | 1 | 0.16 | 0.10 | 0.76 | 16.17 | 0.69 | 1 | 0.91 | 2.59 | 0.11 | 0.00 | 0.00 |
| | Puesta x Zona | 1 | 2.19 | 1.29 | 0.26 | 31.03 | 1.33 | 1 | 0.21 | 0.61 | 0.44 | 16.36 | 2.09 |
| | Error | 51 | 1.70 | | | 23.42 | | 58 | 0.35 | | | 7.85 | |
| Cenizas | Puesta | 1 | 0.001 | 0.02 | 0.89 | 13.89 | 4.29 | 1 | 0.141 | 10.22 | <0.01 | 1.40 | 0.86 |
| | Zona | 1 | 0.006 | 0.15 | 0.70 | 0.92 | 0.28 | 1 | 0.005 | 0.36 | 0.55 | 0.00 | 0.00 |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.005 | 0.12 | 0.73 | 2.49 | 0.77 | 1 | 0.001 | 0.07 | 0.79 | 0.18 | 0.11 |
| | Error | 51 | 0.042 | | | 3.24 | | 58 | 0.014 | | | 1.63 | |

Tabla 4.7. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido en agua, materia orgánica (MO) y cenizas por mg de tejido (peso húmedo, PH) y por huevo individual entre puestas (1ª o posteriores) y zonas geográficas (ría de Arousa/ría A Coruña) dentro del ciclo de cría de 1999. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| | | Por huevo (µg/huevo) | | | | | | Por tejido (µg/mg de PH) | | | | | |
|------------|---------------|----------------------|-------|-------|--------|--------|-------|--------------------------|--------|--------|---|----|---|
| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P | MC | F | gl | MC | F | P | MC | F |
| | | gl | MC | F | P | MC | F | gl | MC | F | P | MC | F |
| Agua | Puesta | 1 | 9.70 | 2.89 | 0.10 | 100.56 | 14.01 | 1 | 0.001 | <0.001 | | | |
| | Zona | 1 | 3.97 | 1.18 | 0.28 | 0.02 | 0.00 | 1 | 0.95 | 0.95 | | | |
| | Puesta x Zona | 1 | 1.24 | 0.37 | 0.55 | 1.04 | 0.15 | 1 | 0.71 | 0.71 | | | |
| | Error | 40 | 3.36 | | | 7.18 | | | | | | | |
| MO | Puesta | 1 | 49.92 | 53.34 | <0.001 | 181.29 | 15.89 | 1 | <0.001 | <0.001 | | | |
| | Zona | 1 | 3.22 | 3.45 | 0.07 | 0.20 | 0.02 | 1 | 0.90 | 0.90 | | | |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.05 | 0.05 | 0.82 | 7.68 | 0.67 | 1 | 0.42 | 0.42 | | | |
| | Error | 40 | 0.94 | | | 11.41 | | | | | | | |
| Cenizas | Puesta | 1 | 0.01 | 0.30 | 0.59 | 11.79 | 4.49 | 1 | <0.05 | <0.05 | | | |
| | Zona | 1 | 0.02 | 0.81 | 0.38 | 0.09 | 0.03 | 1 | 0.86 | 0.86 | | | |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.03 | 0.94 | 0.34 | 3.06 | 1.16 | 1 | 0.29 | 0.29 | | | |
| | Error | 40 | 0.03 | | | 2.63 | | | | | | | |

4.3.3. Composición bioquímica de la puesta.

Para el estudio de la composición bioquímica de los huevos recién desovados (estado I) de *M. brachydactyla* entre puestas, años y zonas geográficas se emplearon dos métodos de estimación: uno indirecto, a partir del análisis elemental de carbono y nitrógeno y otro directo, mediante medidas directas de lípidos y carbohidratos. El contenido de nitrógeno se empleó para estimar mediante un factor de conversión (Gnaiger & Bitterlich, 1984) las proteínas. Asimismo, se hizo un cálculo del contenido de energía utilizando dos métodos de estimación indirecta, un método a partir de carbono, energía^s (Salonen *et al.*, 1976) y otro método a partir de lípidos, proteínas y carbohidratos, energía^w (Winberg, 1971).

En general, la composición bioquímica de los huevos recién desovados presentó un patrón opuesto entre las variables por mg de tejido o por huevo individual, siendo las variables por mg de tejido superiores en las puestas posteriores y las variables por huevo individual más elevadas en las primeras puestas para las dos zonas de estudio.

En el contenido de carbono, lípidos y carbohidratos por mg de tejido ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) se observaron diferencias significativas entre puestas (ANOVA, $p < 0.01$ para carbono y carbohidratos de la ría de A Coruña y $p < 0.001$ para el resto de variables), apreciándose los valores más altos en las puestas posteriores, con valores medios de $527.4 \pm 10.30 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para el carbono, $252.1 \pm 6.30 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para los lípidos y $56.6 \pm 3.25 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para los carbohidratos en la ría de Arousa y $507.7 \pm 10.0 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para el carbono, $239.2 \pm 5.51 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para los lípidos y $53.4 \pm 3.52 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para los carbohidratos en la ría de A Coruña (Figs. 4.5 y 4.6, Tablas 4.8 y 4.9). El contenido de proteínas por mg de tejido presentó la misma tendencia significativa (ANOVA, $p < 0.05$ para la ría de Arousa y $p < 0.01$ para la ría de A Coruña), con valores más elevados en las puestas posteriores de cada ciclo de cría en las dos rías.

Por huevo individual, el contenido de carbono, lípidos y proteínas mostró diferencias significativas entre puestas (ANOVA, $p < 0.05$ para lípidos y $p < 0.01$ para carbono en la ría de Arousa y $p < 0.001$ en el resto de variables), con valores superiores para todas las variables en las primeras puestas.

A nivel interanual, en la ría de Arousa el contenido de carbono, lípidos y carbohidratos por mg de tejido ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) fue más elevado en el año 1999 (ANOVA, $p < 0.05$ para los carbohidratos y $p < 0.001$ para el resto), con valores medios de $528.7 \pm 9.1 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para el carbono, $252.5 \pm 5.50 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para los lípidos y $55.7 \pm 3.32 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para los carbohidratos (Figs. 4.5 y 4.6, Tablas 4.8 y 4.9). En la ría de A Coruña, el contenido de carbohidratos y proteínas presentó diferencias interanuales significativas (ANOVA, $p < 0.01$ para proteínas y $p < 0.001$ para carbohidratos), observándose valores más elevados en el año 2003, con valores medios de $53.6 \pm 3.50 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para los carbohidratos y $629.7 \pm 2.50 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para las proteínas (Figs. 4.5 y 4.6, Tablas 4.8 y 4.9). El efecto de la interacción puesta-año fue significativo (ANOVA, $p < 0.05$) para el contenido de carbono por mg de tejido ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) en la ría de Arousa, con un valor medio en las puestas posteriores del ciclo del 1999 muy superior al resto de grupos ($536.0 \pm 6.67 \mu\text{g}/\text{mg PS}$).

Las diferencias interanuales a nivel de huevo individual solo fueron significativas (ANOVA, $p < 0.001$) para el contenido en carbohidratos en la ría de A Coruña, observándose que los huevos del año 2003 presentaron los valores más altos ($4.78 \pm 0.29 \mu\text{g}/\text{huevo}$).

Las diferencias espaciales fueron significativas (ANOVA, $p < 0.001$) para todas las variables, tanto por mg de tejido como por huevo, apreciándose mayores valores en la ría de Arousa (Tabla 4.10). En esta ría las puestas presentaron valores por mg de tejido un 5.0% más elevados para el carbono, un 6.9% para los lípidos, un 2.3% para las proteínas y un 11.9% para los carbohidratos, mientras que por huevo individual fueron un 6.8% más altos los valores de carbono, un 8.5% los de lípidos, un 4.2% los de proteínas y un 13.8% los de carbohidratos. En general, dentro de cada zona se mantuvo la tendencia observada anteriormente: mayores valores de las variables por huevo en la primera puesta y valores más altos de las variables por mg de tejido en las puestas posteriores.

Las relaciones C/N y lípidos/proteínas mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$ para la relación C/N en A Coruña y $p < 0.01$ para el resto) entre puestas, siendo mayor en las puestas posteriores del ciclo de cría, con valores medios de 4.73 ± 0.09 en Arousa y de 4.66 ± 0.09 en A Coruña para la relación C/N y de 0.39 ± 0.009 en Arousa y de 0.38 ± 0.008 en A Coruña para la relación lípidos/proteínas (Figs. 4.7 y 4.8, Tablas 4.8 y 4.9). También se observaron diferencias interanuales significativas (ANOVA, $p < 0.001$) en estas relaciones en la ría de Arousa, siendo el ciclo de cría del 1999 donde se apreciaron los valores más elevados de estas relaciones.

En la comparación entre zonas geográficas para el ciclo de cría de 1999, se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) con valores más elevados de la relación C/N (4.76 ± 0.08) y la relación lípidos/proteínas (0.39 ± 0.01) en la ría de Arousa (Tabla 4.10). Dentro de cada zona, se apreció la misma tendencia de valores significativamente (ANOVA, $p < 0.001$) más altos de la relación C/N y de la relación lípidos/proteínas en las puestas posteriores.

El contenido energético, en términos de energía^s y de energía^w, presentó un patrón inverso entre su contenido por mg de tejido (J/mg PS) y por huevo individual, al igual que se observó en las variables bioquímicas descritas anteriormente (Figs. 4.7 y 4.8, Tablas 4.8 y 4.9). Entre puestas, el contenido energético por mg de tejido (J/mg PS) mostró diferencias significativas, tanto en la ría de Arousa (ANOVA, $p < 0.001$) como en la ría de A Coruña (ANOVA, $p < 0.01$ para energía^s y $p < 0.001$ para energía^w), observándose valores superiores (un 1.5% de energía^s y un 1.2% de energía^w en la ría de Arousa y un 1.4% de energía^s y un 1.0% de energía^w en la ría de A Coruña) en las puestas posteriores frente a las primeras puestas. En cambio, en el contenido energético por huevo (J/huevo), donde también se apreciaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$ para energía^s y $p < 0.01$ para energía^w en Arousa y $p < 0.001$ para las dos variables en A Coruña) entre puestas, los valores más altos se observaron en las primeras puestas del ciclo de cría.

En la ría de Arousa, las diferencias interanuales fueron significativas (ANOVA, $p < 0.001$) para las dos variables de energía por mg de tejido, con valores más elevados (24.3 ± 0.42 J/mg PS de energía^s y 26.1 ± 0.27 J/mg PS de energía^w) en el ciclo de cría de 1999, mientras que en la ría de A Coruña solo fueron significativas (ANOVA, $p < 0.05$) para el contenido de energía^w, apreciándose los valores más elevados en el año 2003 (25.2 ± 0.25 de J/mg PS). El efecto de la interacción puesta-año fue significativo (ANOVA, $p < 0.05$) para la energía^s por mg de tejido en la ría de Arousa, observándose que las puestas posteriores del ciclo de cría de 1999 mostraron los mayores valores de energía (24.7 ± 0.31 J/mg PS).

Entre zonas geográficas se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$), siendo la ría de Arousa la que presentó los valores más altos de energía^s y de energía^w tanto por tejido (J/mg PS) como por huevo individual (Tabla 4.10). Dentro de cada zona se observó de nuevo la misma tendencia entre puestas, con valores más elevados de contenido energético por huevo en las primeras puestas y por mg de tejido en las puestas posteriores.

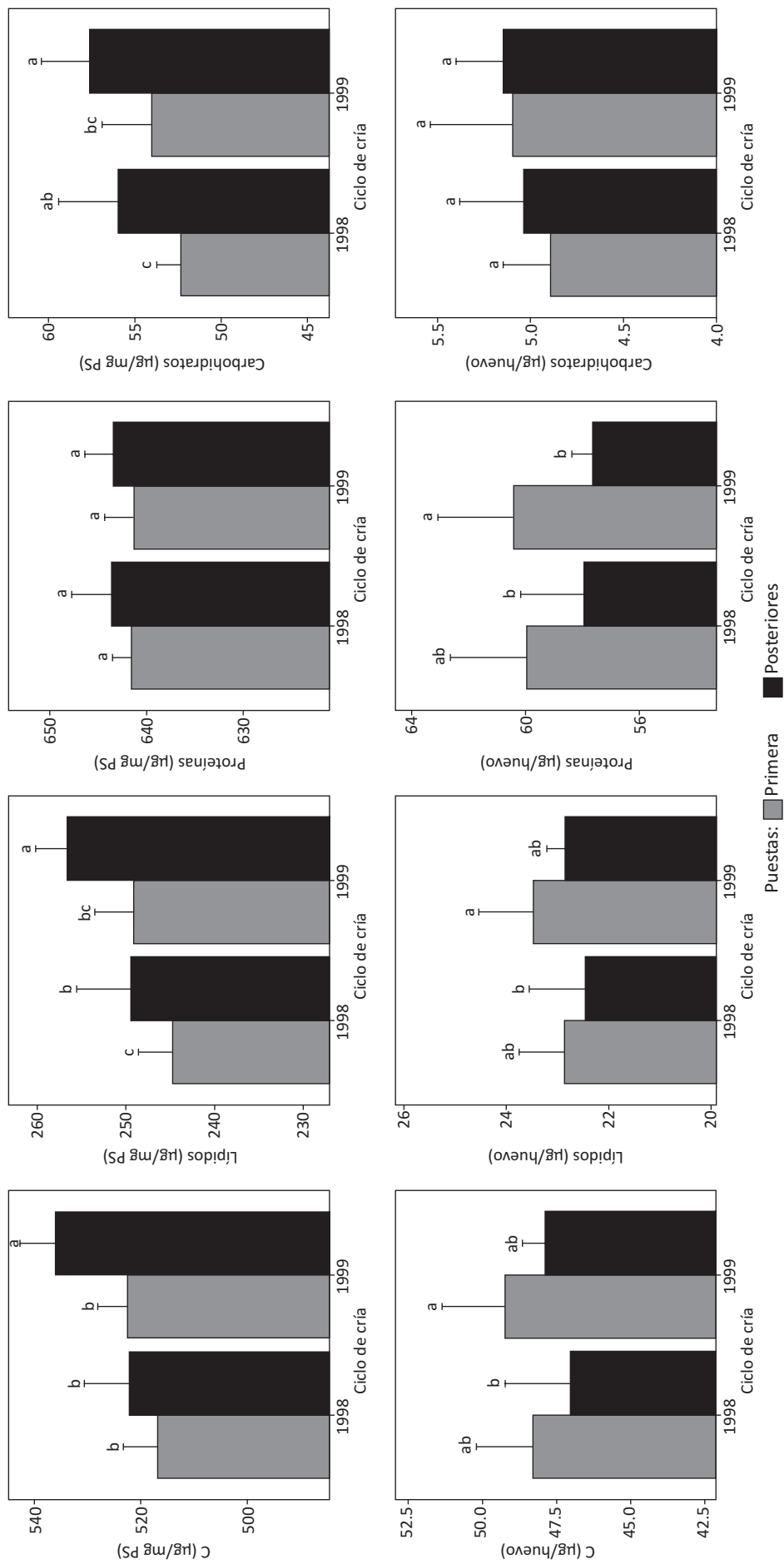


Fig. 4.5. Cambios en el contenido de carbono (C), lípidos, proteínas, y carbohidratos de las puestas (µg/mg PS) (arriba) y de los huevos individuales (abajo) en los ciclos de cría (1998 y 1999) de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre las puestas de los dos ciclos de cría (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

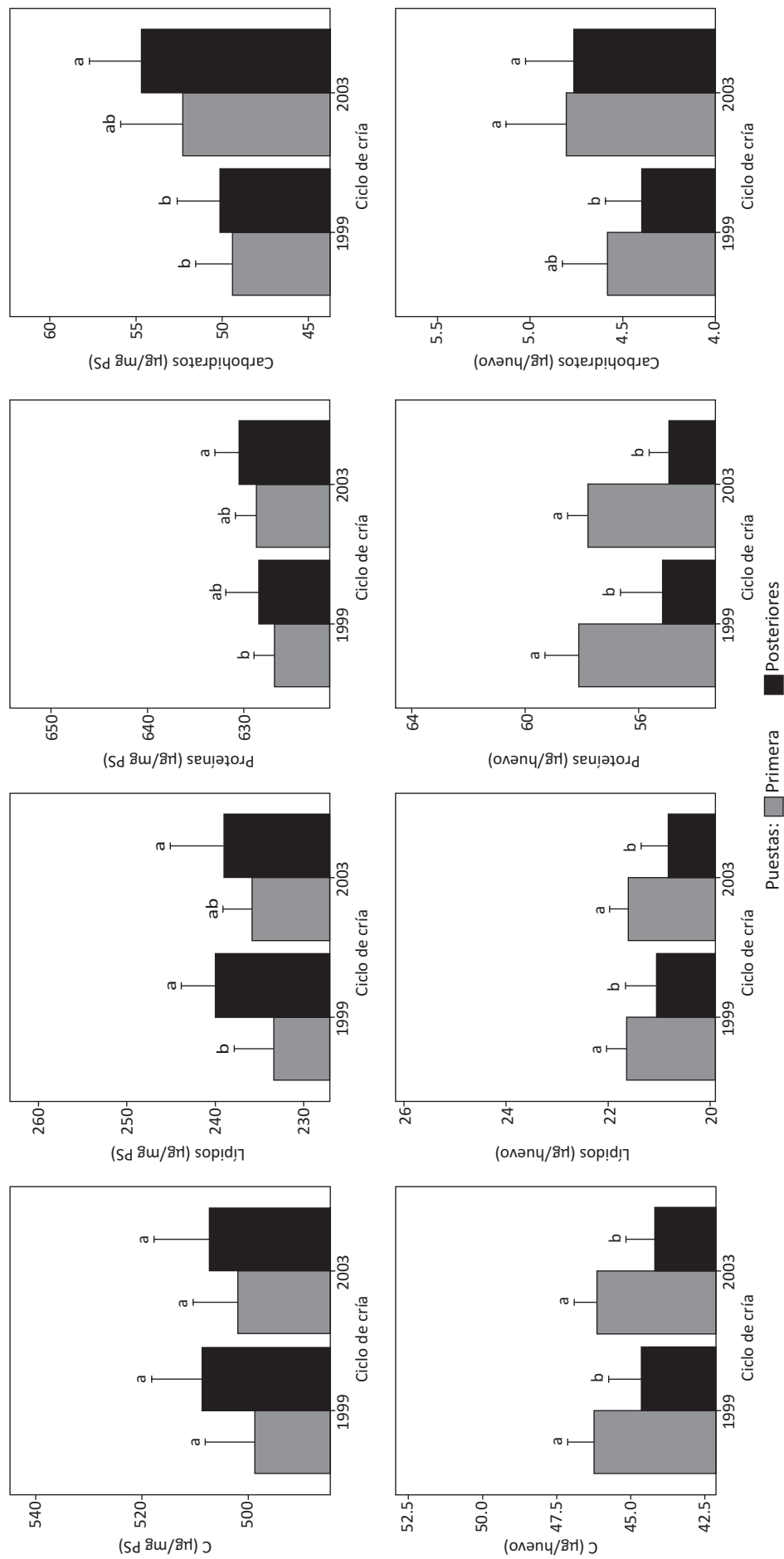


Fig. 4.6. Cambios en el contenido de carbono (C), lípidos, proteínas y carbohidratos de las puestas ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) (arriba) y de los huevos individuales (abajo) en los dos ciclos de cría (1999 y 2003) de *M. brachydactyla* en la ría de A Coruña. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre las puestas de los dos ciclos de cría (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

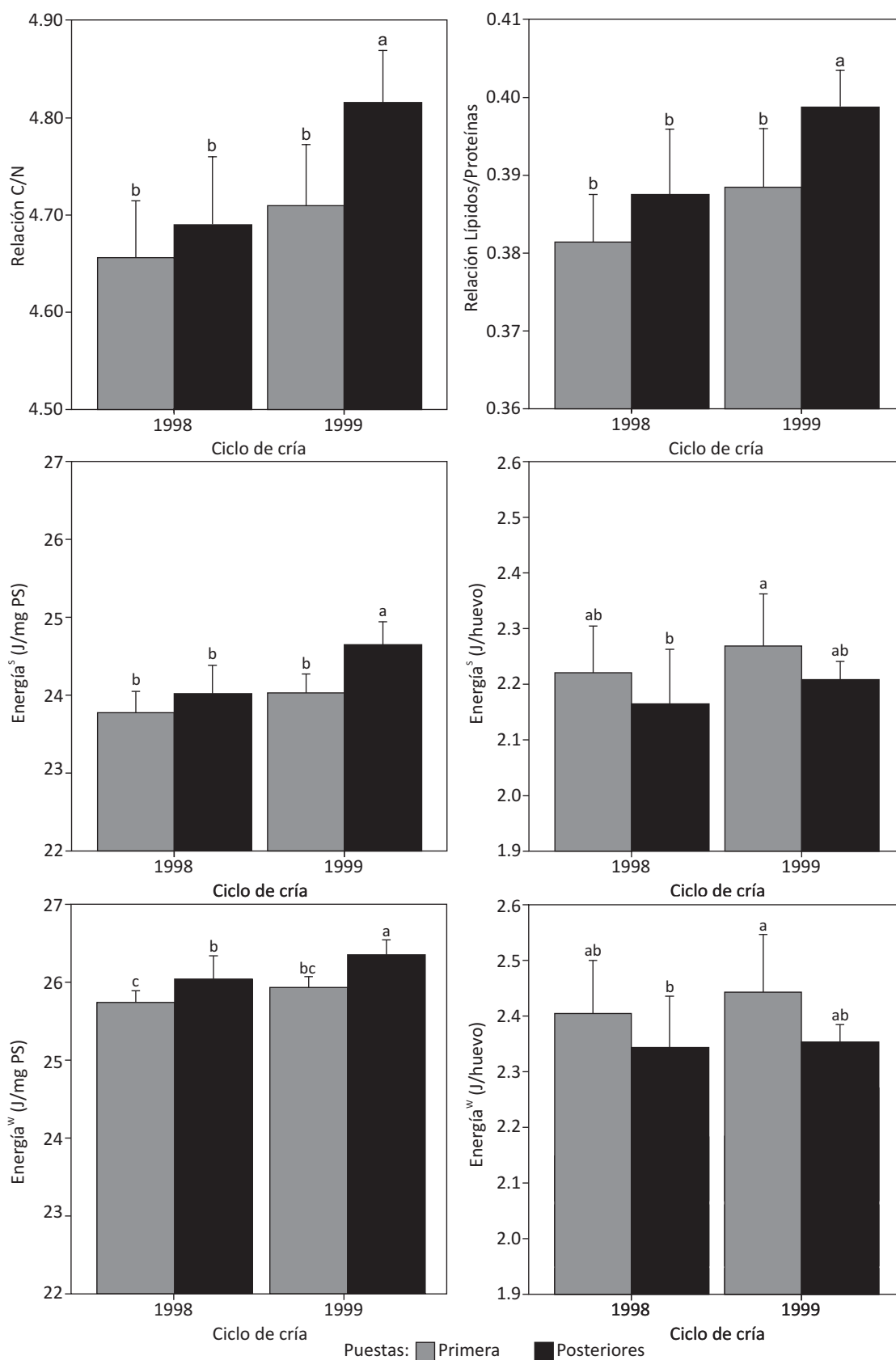


Fig. 4.7. Cambios en la relación C/N y en la relación lípidos/proteínas (arriba) y de energía^s y energía^w de las puestas (J/mg PS, centro y abajo, izquierda) y de los huevos individuales (centro y abajo, derecha) en los dos ciclos de cría (1998 y 1999) de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre las puestas de los dos ciclos de cría (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

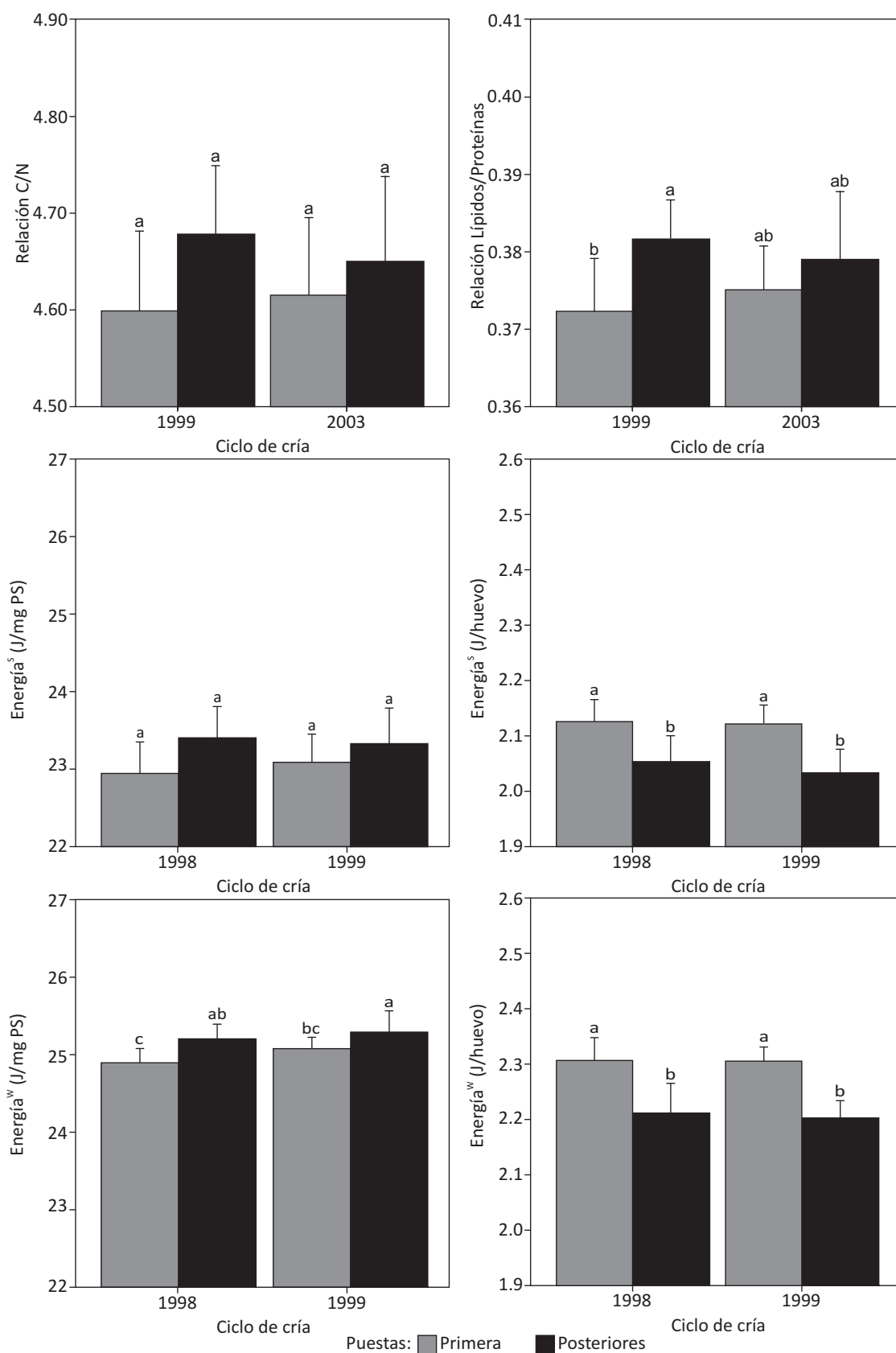


Fig. 4.8. Cambios en la relación C/N y en la relación lípidos/proteínas (arriba) y de energía^s y energía^w de las puestas (J/mg PS, centro y abajo, izquierda) y de los huevos individuales (centro y abajo, derecha) en los dos ciclos de cría (1998 y 1999) de *M. brachydactyla* en la ría de A Coruña. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre las puestas de los dos ciclos de cría (test post-hoc de Tukey, p<0.05).

Tabla 4.8. Variaciones interanuales y estacionales en el contenido en carbono (C), lípidos (Lip), proteínas (Prot), carbohidratos (Carbo), relación C/N, relación lípidos/proteínas (Lip/Prot), energía^s y energía^w por mg de tejido (peso seco, PS), por porcentaje y por huevo individual recién desovado de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Parámetros | Ría de Arousa | | | Ría de A Coruña | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | 1998 | | 1999 | 1999 | | 2003 |
| | 1ª Puesta | Puestas posteriores | 1ª Puesta | Puestas posteriores | 1ª Puesta | Puestas posteriores |
| C ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 516.85 \pm 6.45 ^b | 522.19 \pm 8.46 ^b | 522.51 \pm 5.61 ^b | 536.04 \pm 6.67 ^a | 498.77 \pm 9.34 ^a | 508.73 \pm 9.45 ^a |
| Lip ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 244.73 \pm 3.86 ^c | 249.43 \pm 6.11 ^b | 249.12 \pm 4.37 ^{bc} | 256.61 \pm 3.57 ^a | 233.40 \pm 4.45 ^b | 239.88 \pm 3.98 ^a |
| Prot ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 641.55 \pm 1.95 ^a | 643.55 \pm 4.19 ^a | 641.25 \pm 3.08 ^a | 643.42 \pm 2.97 ^a | 626.81 \pm 2.14 ^b | 628.46 \pm 3.39 ^{ab} |
| Carbo ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 52.34 \pm 1.39 ^c | 55.97 \pm 3.44 ^{ab} | 54.02 \pm 2.88 ^{bc} | 57.62 \pm 2.79 ^a | 49.40 \pm 2.14 ^b | 50.13 \pm 2.49 ^b |
| Relación C/N | 4.66 \pm 0.06 ^b | 4.69 \pm 0.08 ^b | 4.71 \pm 0.07 ^b | 4.82 \pm 0.06 ^a | 4.60 \pm 0.09 ^a | 4.68 \pm 0.07 ^a |
| Relación Lip/Prot | 0.38 \pm 0.01 ^b | 0.39 \pm 0.01 ^b | 0.39 \pm 0.01 ^b | 0.40 \pm 0.01 ^a | 0.37 \pm 0.01 ^b | 0.38 \pm 0.01 ^a |
| Energía ^s (J/mg PS) | 23.77 \pm 0.30 ^b | 24.02 \pm 0.39 ^b | 24.04 \pm 0.26 ^b | 24.66 \pm 0.31 ^a | 22.94 \pm 0.43 ^a | 23.40 \pm 0.43 ^a |
| Energía ^w (J/mg PS) | 25.74 \pm 0.16 ^c | 26.04 \pm 0.32 ^b | 25.94 \pm 0.14 ^{bc} | 26.35 \pm 0.21 ^a | 24.89 \pm 0.20 ^c | 25.20 \pm 0.20 ^{ab} |
| C ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 48.29 \pm 1.91 ^{ab} | 47.03 \pm 2.21 ^b | 49.23 \pm 2.13 ^a | 47.89 \pm 0.76 ^{ab} | 46.23 \pm 0.90 ^a | 44.64 \pm 1.11 ^b |
| Lip ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 22.86 \pm 0.89 ^{ab} | 22.46 \pm 1.10 ^b | 23.47 \pm 1.07 ^a | 22.86 \pm 0.36 ^{ab} | 21.64 \pm 0.40 ^a | 21.05 \pm 0.61 ^b |
| Prot ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 59.95 \pm 2.69 ^{ab} | 57.94 \pm 2.23 ^b | 60.42 \pm 2.66 ^a | 57.64 \pm 0.73 ^b | 58.11 \pm 1.19 ^a | 55.16 \pm 1.49 ^b |
| Carbo ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 4.89 \pm 0.25 ^a | 5.04 \pm 0.34 ^a | 5.10 \pm 0.44 ^a | 5.15 \pm 0.25 ^a | 4.58 \pm 0.24 ^{ab} | 4.40 \pm 0.20 ^b |
| Energía ^s (J/huevo) | 2.22 \pm 0.09 ^{ab} | 2.16 \pm 0.10 ^b | 2.27 \pm 0.10 ^a | 2.21 \pm 0.03 ^{ab} | 2.13 \pm 0.04 ^a | 2.05 \pm 0.05 ^b |
| Energía ^w (J/huevo) | 2.41 \pm 0.10 ^{ab} | 2.34 \pm 0.10 ^b | 2.44 \pm 0.11 ^a | 2.35 \pm 0.03 ^{ab} | 2.31 \pm 0.04 ^a | 2.21 \pm 0.06 ^b |
| C (% PS) | 51.68 \pm 0.62 | 52.22 \pm 0.82 | 52.25 \pm 0.54 | 53.60 \pm 0.64 | 49.88 \pm 0.89 | 50.87 \pm 0.89 |
| Lip (% PS) | 24.47 \pm 0.37 | 24.94 \pm 0.59 | 24.91 \pm 0.42 | 25.66 \pm 0.34 | 23.34 \pm 0.42 | 23.99 \pm 0.37 |
| Prot (% PS) | 64.15 \pm 0.19 | 64.36 \pm 0.41 | 64.12 \pm 0.30 | 64.34 \pm 0.28 | 62.68 \pm 0.20 | 62.85 \pm 0.32 |
| Carbo (% PS) | 5.23 \pm 0.13 | 5.60 \pm 0.33 | 5.40 \pm 0.28 | 5.76 \pm 0.27 | 4.94 \pm 0.20 | 5.01 \pm 0.24 |
| | | | | | 5.23 \pm 0.35 | 5.47 \pm 0.29 |

Tabla 4.9. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido de carbono (C), lípidos (Líp), proteínas (Prot), carbohidratos (Carbo), relación C/N, relación lípidos/proteínas (Líp/Prot), energía^s y energía^w por mg de tejido (peso seco, PS) y por huevo individual recién desovado o entre puestas (1^a o posteriores) y ciclos de cría (1998/1999 o 1999/2003) de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y la ría de A Coruña. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| | | Ría de Arousa | | | | | | Ría de A Coruña | | | | | |
|----------------------|--------------|---------------|----------------------|-------|--------|--------------------------|-------|-----------------|----|----------------------|--------|--------|--------|
| Parámetros | Factor | gl | Por huevo (µg/huevo) | | | Por tejido (µg/mg de PS) | | | gl | Por huevo (µg/huevo) | | | P |
| | | | MC | F | P | MC | F | P | | MC | F | P | |
| C | Puesta | 1 | 27.09 | 7.40 | <0.01 | 826.40 | 16.61 | <0.001 | 1 | 53.25 | 63.47 | <0.001 | <0.01 |
| | Año | 1 | 10.82 | 2.96 | 0.09 | 1295.70 | 26.04 | <0.001 | 1 | 0.91 | 1.09 | 0.30 | 0.70 |
| | Puesta x Año | 1 | 0.02 | 0.01 | 0.94 | 223.30 | 4.49 | <0.05 | 1 | 0.42 | 0.50 | 0.48 | 0.37 |
| | Error | 51 | 3.66 | | | 49.80 | | | 58 | 0.84 | | | |
| Líp | Puesta | 1 | 4.25 | 4.85 | <0.05 | 374.90 | 16.35 | <0.001 | 1 | 8.20 | 36.00 | <0.001 | <0.001 |
| | Año | 1 | 3.32 | 3.78 | 0.06 | 450.90 | 19.67 | <0.001 | 1 | 0.22 | 0.97 | 0.33 | 0.52 |
| | Puesta x Año | 1 | 0.15 | 0.17 | 0.68 | 25.70 | 1.12 | 0.29 | 1 | 0.13 | 0.57 | 0.45 | 0.21 |
| | Error | 51 | 0.88 | | | 22.90 | | | 58 | 0.23 | | | |
| Prot | Puesta | 1 | 76.38 | 14.92 | <0.001 | 60.61 | 5.67 | <0.05 | 1 | 131.42 | 147.11 | <0.001 | <0.01 |
| | Año | 1 | 0.07 | 0.01 | 0.91 | 0.61 | 0.06 | 0.81 | 1 | 1.02 | 1.15 | 0.29 | <0.01 |
| | Puesta x Año | 1 | 1.97 | 0.39 | 0.54 | 0.09 | 0.01 | 0.93 | 1 | 0.03 | 0.03 | 0.86 | 0.90 |
| | Error | 51 | 5.12 | | | 10.69 | | | 58 | 0.89 | | | |
| Carbo | Puesta | 1 | 0.10 | 0.86 | 0.35 | 160.11 | 20.35 | <0.001 | 1 | 0.06 | 0.82 | 0.37 | <0.01 |
| | Año | 1 | 0.32 | 2.84 | 0.10 | 36.71 | 4.67 | <0.05 | 1 | 1.15 | 15.54 | <0.001 | <0.001 |
| | Puesta x Año | 1 | 0.03 | 0.26 | 0.61 | 0.00 | 0.00 | 0.99 | 1 | 0.07 | 0.94 | 0.34 | 0.31 |
| | Error | 51 | 0.11 | | | 7.87 | | | 58 | 0.07 | | | |
| C/N | Puesta | 1 | 0.042 | 9.46 | <0.01 | | | | 1 | 0.036 | 4.83 | <0.05 | |
| | Año | 1 | 0.111 | 24.71 | <0.001 | | | | 1 | 0.000 | 0.05 | 0.83 | |
| | Puesta x Año | 1 | 0.015 | 3.46 | 0.07 | | | | 1 | 0.006 | 0.81 | 0.37 | |
| | Error | 51 | 0.004 | | | | | | 58 | 0.008 | | | |
| Líp/Prot | Puesta | 1 | 0.00078 | 10.03 | <0.01 | | | | 1 | 0.00049 | 7.41 | <0.01 | |
| | Año | 1 | 0.00117 | 15.07 | <0.001 | | | | 1 | 0.00000 | 0.04 | 0.85 | |
| | Puesta x Año | 1 | 0.00004 | 0.46 | 0.50 | | | | 1 | 0.00018 | 2.66 | 0.11 | |
| | Error | 51 | 0.00008 | | | | | | 58 | 0.00007 | | | |
| Energía ^s | Puesta | 1 | 0.0564 | 7.15 | <0.05 | 1.75 | 16.62 | <0.001 | 1 | 0.1101 | 62.47 | <0.001 | <0.01 |
| | Año | 1 | 0.0246 | 3.12 | 0.08 | 2.75 | 26.14 | <0.001 | 1 | 0.0017 | 0.94 | 0.34 | 0.70 |
| | Puesta x Año | 1 | 0.0001 | 0.01 | 0.92 | 0.47 | 4.45 | <0.05 | 1 | 0.0008 | 0.44 | 0.51 | 0.37 |
| | Error | 51 | 0.0079 | | | 0.11 | | | 58 | 0.0018 | | | |
| Energía ^w | Puesta | 1 | 0.081 | 9.41 | <0.01 | 1.35 | 25.48 | <0.001 | 1 | 0.157 | 112.03 | <0.001 | <0.001 |
| | Año | 1 | 0.007 | 0.86 | 0.36 | 0.86 | 16.12 | <0.001 | 1 | 0.000 | 0.23 | 0.63 | <0.05 |
| | Puesta x Año | 1 | 0.003 | 0.33 | 0.57 | 0.04 | 0.81 | 0.37 | 1 | 0.000 | 0.09 | 0.77 | 0.42 |
| | Error | 51 | 0.009 | | | 0.05 | | | 58 | 0.001 | | | |

Tabla 4.10. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido de carbono (C), lípidos (Lip), proteínas (Prot), carbohidratos (Carbo), relación C/N, relación lípidos/proteínas (Lip/Prot), energía^s y energía^w por mg de tejido (peso seco, PS) y por huevo individual recién desovado entre puestas (1ª o posteriores) y zonas geográficas (ría de Arousa/ría A Coruña) dentro del ciclo de cría de 1999. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | Por huevo (µg/huevo) | | | | Por tejido (µg/mg de PS) | | |
|----------------------|---------------|----------------------|---------|--------|--------|--------------------------|--------|--------|
| | | gl | MC | F | P | MC | F | P |
| C | Puesta | 1 | 22.33 | 11.467 | <0.01 | 1603.00 | 26.61 | <0.001 |
| | Zona | 1 | 105.52 | 54.193 | <0.001 | 7017.00 | 116.48 | <0.001 |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.17 | 0.087 | 0.77 | 35.00 | 0.57 | 0.45 |
| | Error | 40 | 1.95 | | | 60.00 | | |
| Líp | Puesta | 1 | 3.74 | 7.697 | <0.01 | 560.20 | 32.89 | <0.001 |
| | Zona | 1 | 36.12 | 74.343 | <0.001 | 2855.00 | 167.62 | <0.001 |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.00 | 0.006 | 0.94 | 2.70 | 0.16 | 0.70 |
| | Error | 40 | 0.49 | | | 17.00 | | |
| Prot | Puesta | 1 | 87.98 | 28.871 | <0.001 | 45.90 | 5.40 | <0.05 |
| | Zona | 1 | 62.15 | 20.396 | <0.001 | 2349.00 | 276.45 | <0.001 |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.08 | 0.026 | 0.87 | 0.70 | 0.09 | 0.77 |
| | Error | 40 | 3.05 | | | 8.50 | | |
| Carbo | Puesta | 1 | 0.03 | 0.292 | 0.59 | 60.00 | 8.81 | <0.01 |
| | Zona | 1 | 4.20 | 43.191 | <0.001 | 382.60 | 56.22 | <0.001 |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.15 | 1.549 | 0.22 | 22.40 | 3.29 | 0.08 |
| | Error | 40 | 0.10 | | | 6.80 | | |
| C/N | Puesta | 1 | 0.095 | 18.855 | <0.001 | | | |
| | Zona | 1 | 0.165 | 32.617 | <0.001 | | | |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.002 | 0.387 | 0.54 | | | |
| | Error | 40 | 0.005 | | | | | |
| Líp/Prot | Puesta | 1 | 0.0012 | 20.579 | <0.001 | | | |
| | Zona | 1 | 0.0024 | 40.218 | <0.001 | | | |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.0000 | 0.001 | 0.98 | | | |
| | Error | 40 | 0.0001 | | | | | |
| Energía ^s | Puesta | 1 | 0.0469 | 11.345 | <0.01 | 3.39 | 26.62 | <0.001 |
| | Zona | 1 | 0.2293 | 55.433 | <0.001 | 14.86 | 116.85 | <0.001 |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.0004 | 0.085 | 0.77 | 0.07 | 0.58 | 0.45 |
| | Error | 40 | 0.0041 | | | 0.13 | | |
| Energía ^w | Puesta | 1 | 0.09183 | 18.81 | <0.001 | 1.51 | 43.08 | <0.001 |
| | Zona | 1 | 0.21159 | 43.34 | <0.001 | 12.93 | 368.83 | <0.001 |
| | Puesta x Zona | 1 | 0.0001 | 0.02 | 0.89 | 0.03 | 0.77 | 0.38 |
| | Error | 40 | 0.00488 | | | 0.04 | | |

4.3.4. Composición de clases de lípidos.

Para el estudio del contenido de las principales clases de lípidos, neutrolípidos (NL), glucolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) en los huevos recién desovados de las dos zonas de estudio solamente se analizaron los años 1998 en la ría de Arousa y 2003 en la ría de A Coruña.

La composición de clases de lípidos mostró diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) para el contenido en glucolípidos y fosfolípidos por mg de tejido en las dos zonas de estudio (Tabla 4.11). Los glucolípidos presentaron valores más elevados en las primeras puestas (29.6 ± 3.03 µg/mg PS en la ría de

Arousa y $25.1 \pm 4.86 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ en la ría de A Coruña) mientras que los fosfolípidos fueron más altos en las puestas posteriores ($133.2 \pm 3.70 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ en la ría de Arousa y $125.9 \pm 5.52 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ en la ría de A Coruña) (Fig. 4.9).

Por huevo individual, se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.01$ para fosfolípidos de la ría de A Coruña y $p < 0.001$ para el resto) en el contenido en glucolípidos y fosfolípidos para las dos rías y en el contenido en neutrolípidos para la ría de A Coruña (Fig. 4.9, Tabla 4.11). Los neutrolípidos y los glucolípidos por huevo fueron mayores en las primeras puestas (NL: $8.8 \pm 0.40 \mu\text{g}/\text{huevo}$ en A Coruña y GL: $2.8 \pm 0.31 \mu\text{g}/\text{huevo}$ en Arousa y $2.3 \pm 0.45 \mu\text{g}/\text{huevo}$ en A Coruña), en cambio los fosfolípidos por huevo fueron más elevados en las puestas posteriores ($12.0 \pm 0.58 \mu\text{g}/\text{huevo}$ en Arousa y $11.0 \pm 0.50 \mu\text{g}/\text{huevo}$ en A Coruña).

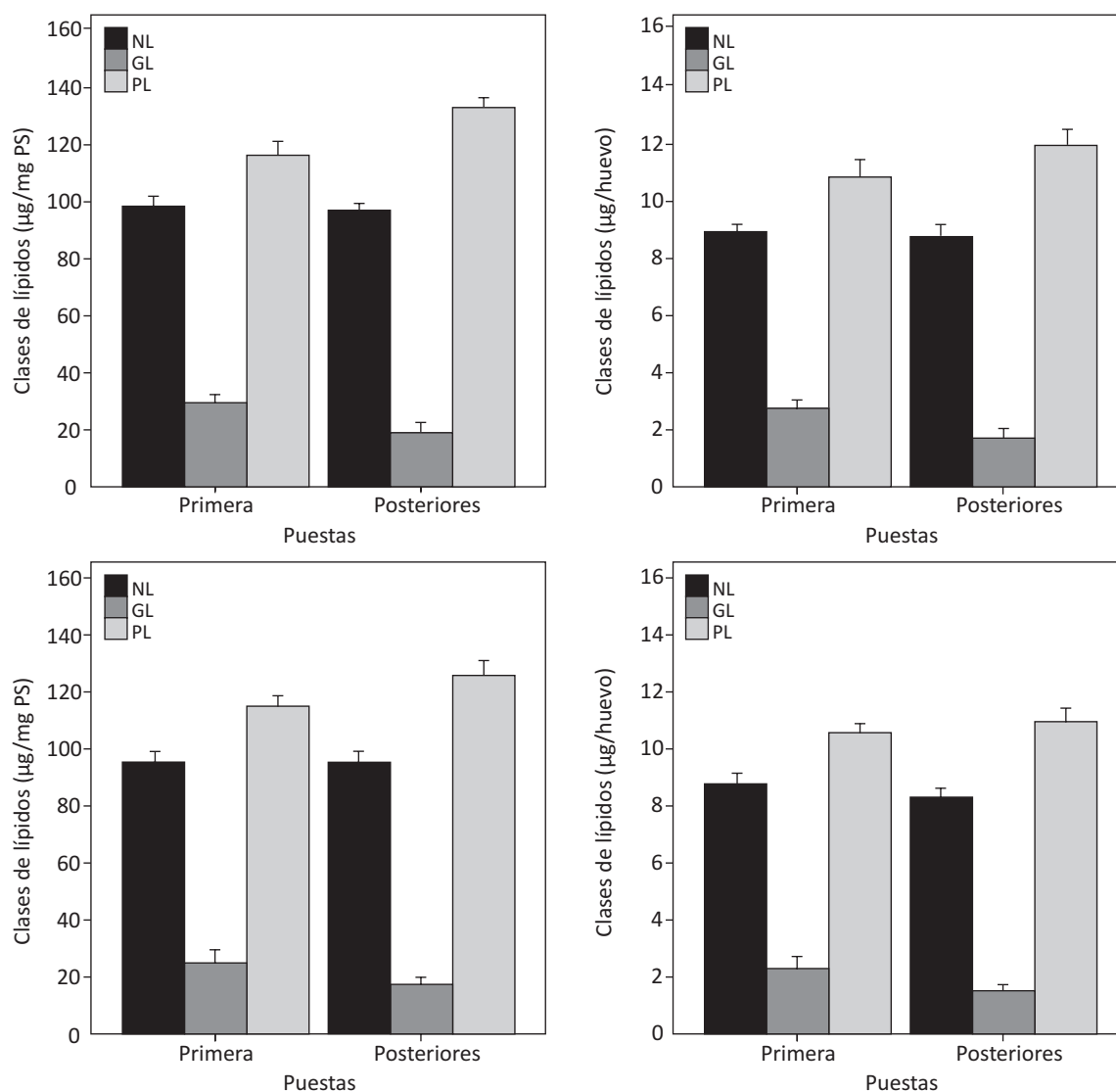


Fig. 4.9. Cambios en el contenido de neutrolípidos (NL), glucolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) de las puestas ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) (izquierda) y de los huevos individuales (derecha) para el ciclo de cría de 1998 en la ría de Arousa (arriba) y para el ciclo de cría de 2003 en la ría de A Coruña (abajo).

Tabla 4.11. Variaciones interanuales y estacionales en el contenido en neutrolípidos (NL), glucolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) por mg de tejido (peso seco, PS), por porcentaje y por huevo recién desovado de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar, el estadístico F y el nivel de significancia P. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Parámetros | Ría de Arousa (1998) | | | | Ría de A Coruña (2003) | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|--------|--------------------------------|--------------------------------|-------|--------|
| | 1ª Puesta | Puestas posteriores | F | P | 1ª Puesta | Puestas posteriores | F | P |
| NL ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 98.62 \pm 3.69 ^a | 97.11 \pm 2.67 ^a | 1.76 | 0.20 | 95.57 \pm 3.92 ^a | 95.53 \pm 3.98 ^a | 0.001 | 0.97 |
| GL ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 29.65 \pm 3.03 ^a | 19.11 \pm 3.87 ^b | 66.57 | <0.001 | 25.14 \pm 4.86 ^a | 17.56 \pm 2.61 ^b | 41.54 | <0.001 |
| FL ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 116.45 \pm 5.16 ^b | 133.21 \pm 3.71 ^a | 111.10 | <0.001 | 115.13 \pm 3.86 ^b | 125.92 \pm 5.52 ^a | 51.55 | <0.001 |
| NL ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 8.93 \pm 0.31 ^a | 8.79 \pm 0.45 ^a | 0.96 | 0.34 | 8.79 \pm 0.40 ^a | 8.32 \pm 0.33 ^b | 17.27 | <0.001 |
| GL ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 2.77 \pm 0.31 ^a | 1.72 \pm 0.36 ^b | 72.04 | <0.001 | 2.31 \pm 0.45 ^a | 1.53 \pm 0.23 ^b | 53.54 | <0.001 |
| FL ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 10.88 \pm 0.65 ^b | 12.00 \pm 0.59 ^a | 25.05 | <0.001 | 10.58 \pm 0.34 ^b | 10.97 \pm 0.50 ^a | 8.27 | <0.01 |
| NL (% Lípidos) | 40.30 \pm 1.24 | 38.94 \pm 0.97 | | | 40.53 \pm 1.67 | 39.97 \pm 1.36 | | |
| GL (% Lípidos) | 12.13 \pm 1.29 | 7.65 \pm 1.40 | | | 10.65 \pm 1.98 | 7.34 \pm 1.03 | | |
| FL (% Lípidos) | 47.58 \pm 1.68 | 53.41 \pm 1.15 | | | 48.81 \pm 1.38 | 52.68 \pm 1.92 | | |

4.3.5. Composición de ácidos grasos

Para el estudio del contenido de los ácidos grasos en los huevos recién desovados de las dos zonas de estudio solamente se analizaron los años 1998 en la ría de Arousa y 2003 en la ría de A Coruña.

4.3.5.1. Perfil de ácidos grasos

En el perfil de ácidos grasos de los huevos recién desovados de *M. brachydactyla* se cuantificaron entre 39 (ría de Arousa) y 41 (ría de A Coruña) ácidos grasos pertenecientes a cuatro grupos: ácidos grasos saturados (SFA; agrupa a 8 o 10 ácidos grasos), ácidos grasos ramificados (BFA; agrupa a 4 ácidos grasos), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA; agrupa a 13 ácidos grasos) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA; agrupa a 14 ácidos grasos) (Tabla 4.12).

El grupo de ácidos grasos observado en mayor proporción fueron los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), con una proporción media de 40.5 \pm 1.34% para la ría de Arousa y de 45.0 \pm 1.51% para la ría de A Coruña (Tabla 4.12). Dentro de este grupo cabe destacar la elevada proporción del 20:5w3 (17.8 \pm 0.42% en Arousa y 21.5 \pm 0.82% en A Coruña) y del 22:6w3 (15.5 \pm 0.62% en Arousa y 16.9 \pm 0.64% en A Coruña). Siguiendo por orden de importancia apareció el grupo de los monoinsaturados (MUFA), cuyo porcentaje medio para la ría de Arousa fue de 29.9 \pm 0.76% y para la ría de A Coruña de 27.5 \pm 1.05%. En este grupo el 18:1w9 destacó por su mayor proporción, con valores medios de 13.1 \pm 0.50% en la ría de Arousa y 12.6 \pm 0.71% en la ría de A Coruña. A continuación, los ácidos grasos saturados (SFA), con un porcentaje ligeramente inferior a los monoinsaturados, oscilaron entre el 25.5% y el 30.9% para la ría de Arousa y entre el 22.9% y el 28.8% para la ría de A Coruña, destacando la predominancia de un ácido graso sobre el resto, el 16:0, con una proporción media de 18.4 \pm 1.51% para la ría de Arousa y de 16.9 \pm 1.53% para la ría de A Coruña. Por último, los ácidos grasos ramificados (BFA), con un porcentaje mucho menor, mostraron un rango de proporciones entre el 0.9% y el 1.6% para la ría de Arousa y entre el 0.7% y el 1.0% para la ría de A Coruña.

Tabla 4.12. Composición de ácidos grasos (% , media \pm desviación estándar) de los huevos recién desovados de las primeras y posteriores puestas de *Maja brachydactyla* en las dos zonas de estudio. También se presenta el porcentaje de los sumatorios por grupos de ácidos grasos saturados (SFA), ramificados (BFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA).

| Parámetros | Ría de Arousa (1998) | | Ría de A Coruña (2003) | |
|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | 1ª Puesta | Puestas posteriores | 1ª Puesta | Puestas posteriores |
| 12:0 (%) | 0.50 \pm 0.03 | 0.43 \pm 0.03 | 0.40 \pm 0.03 | 0.37 \pm 0.04 |
| 13:0 (%) | 0.06 \pm 0.03 | 0.05 \pm 0.05 | 0.04 \pm 0.02 | 0.05 \pm 0.02 |
| 14:0 (%) | 2.59 \pm 0.26 | 3.54 \pm 0.22 | 2.60 \pm 0.31 | 2.66 \pm 0.28 |
| 15:0 (%) | 1.07 \pm 0.03 | 1.18 \pm 0.05 | 1.13 \pm 0.03 | 0.92 \pm 0.42 |
| 16:0 (%) | 20.02 \pm 0.53 | 17.19 \pm 0.51 | 18.43 \pm 0.43 | 15.56 \pm 0.54 |
| 18:0 (%) | 5.64 \pm 0.26 | 4.35 \pm 0.23 | 5.33 \pm 0.16 | 5.48 \pm 0.24 |
| 20:0 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.09 \pm 0.03 | 0.11 \pm 0.04 |
| 21:0 (%) | 0.02 \pm 0.03 | 0.07 \pm 0.06 | 0.07 \pm 0.02 | 0.06 \pm 0.03 |
| 22:0 (%) | 0.05 \pm 0.03 | 0.10 \pm 0.08 | 0.07 \pm 0.03 | 0.06 \pm 0.03 |
| 23:0 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.03 \pm 0.02 | 0.02 \pm 0.03 |
| ΣSFA (%) | 29.95 \pm 0.61 | 26.90 \pm 0.64 | 28.13 \pm 0.48 | 25.29 \pm 0.77 |
| Iso 15:0 (%) | 0.25 \pm 0.03 | 0.23 \pm 0.04 | 0.22 \pm 0.02 | 0.18 \pm 0.02 |
| Anteiso 15:0 (%) | 0.42 \pm 0.07 | 0.48 \pm 0.13 | 0.29 \pm 0.06 | 0.38 \pm 0.04 |
| Iso 16:0 (%) | 0.40 \pm 0.07 | 0.40 \pm 0.06 | 0.26 \pm 0.03 | 0.22 \pm 0.02 |
| Anteiso 16:0 (%) | 0.29 \pm 0.06 | 0.32 \pm 0.05 | 0.07 \pm 0.03 | 0.09 \pm 0.02 |
| ΣBFA (%) | 1.36 \pm 0.09 | 1.43 \pm 0.18 | 0.84 \pm 0.06 | 0.87 \pm 0.05 |
| 14:1w5 (%) | 0.04 \pm 0.03 | 0.02 \pm 0.04 | 0.07 \pm 0.05 | 0.05 \pm 0.04 |
| 16:1w7 (%) | 8.77 \pm 0.38 | 6.82 \pm 0.63 | 8.31 \pm 0.79 | 6.27 \pm 0.62 |
| 16:1w5 (%) | 0.12 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.05 | 0.02 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.03 |
| 17:1w8 (%) | 0.52 \pm 0.06 | 0.41 \pm 0.03 | 0.44 \pm 0.03 | 0.37 \pm 0.03 |
| 18:1w13 (%) | 0.63 \pm 0.07 | 0.55 \pm 0.04 | 0.56 \pm 0.03 | 0.54 \pm 0.03 |
| 18:1w9 (%) | 12.77 \pm 0.41 | 13.36 \pm 0.38 | 11.99 \pm 0.42 | 13.09 \pm 0.47 |
| 18:1w7 (%) | 5.35 \pm 0.34 | 7.00 \pm 0.39 | 4.94 \pm 1.00 | 5.87 \pm 0.29 |
| 20:1w15 (%) | 0.07 \pm 0.06 | 0.09 \pm 0.06 | 0.04 \pm 0.03 | 0.09 \pm 0.05 |
| 20:1w14 (%) | 0.50 \pm 0.03 | 0.53 \pm 0.07 | 0.38 \pm 0.02 | 0.19 \pm 0.02 |
| 20:1w9 (%) | 0.60 \pm 0.12 | 0.94 \pm 0.28 | 0.50 \pm 0.08 | 1.03 \pm 0.96 |
| 22:1w9 (%) | 0.03 \pm 0.03 | 0.26 \pm 0.10 | 0.01 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.11 |
| 23:1w9 (%) | 0.05 \pm 0.04 | 0.06 \pm 0.10 | 0.04 \pm 0.03 | 0.02 \pm 0.03 |
| 24:1w9 (%) | 0.02 \pm 0.03 | 0.08 \pm 0.05 | 0.02 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.04 |
| Σ MUFA (%) | 29.44 \pm 0.50 | 30.26 \pm 0.71 | 27.31 \pm 1.09 | 27.71 \pm 0.96 |
| 18:2w6 (%) | 1.70 \pm 0.06 | 1.57 \pm 0.05 | 1.81 \pm 0.05 | 1.77 \pm 0.07 |
| 18:3w6 (%) | 0.02 \pm 0.03 | 0.02 \pm 0.04 | 0.01 \pm 0.02 | 0.02 \pm 0.02 |
| 18:3w3 (%) | 1.09 \pm 0.04 | 1.08 \pm 0.05 | 0.70 \pm 0.31 | 0.76 \pm 0.30 |
| 20:3w6 (%) | 0.02 \pm 0.02 | 0.08 \pm 0.05 | 0.02 \pm 0.02 | 0.06 \pm 0.04 |
| 20:4w6 (%) | 1.87 \pm 0.08 | 3.80 \pm 0.34 | 2.00 \pm 0.07 | 3.66 \pm 0.30 |
| 20:2w9,15 (%) | 0.23 \pm 0.10 | 0.21 \pm 0.04 | 0.05 \pm 0.03 | 0.09 \pm 0.01 |
| 20:2w6,15 (%) | 0.11 \pm 0.05 | 0.07 \pm 0.07 | 0.02 \pm 0.02 | 0.01 \pm 0.02 |
| 20:2w6 (%) | 0.40 \pm 0.08 | 0.14 \pm 0.12 | 0.25 \pm 0.05 | 0.44 \pm 0.06 |
| 20:3w3 (%) | 0.08 \pm 0.06 | 0.13 \pm 0.05 | 0.04 \pm 0.02 | 0.08 \pm 0.08 |
| 20:4w3 (%) | 0.10 \pm 0.06 | 0.10 \pm 0.05 | 0.02 \pm 0.06 | 0.06 \pm 0.05 |
| 20:5w3 (%) | 17.99 \pm 0.44 | 17.69 \pm 0.35 | 21.59 \pm 0.78 | 21.41 \pm 0.83 |
| 22:2w6 (%) | 0.03 \pm 0.04 | 0.01 \pm 0.03 | 0.02 \pm 0.03 | 0.01 \pm 0.01 |
| 22:5w3 (%) | 0.56 \pm 0.04 | 0.58 \pm 0.06 | 0.62 \pm 0.03 | 0.64 \pm 0.05 |
| 22:6w3 (%) | 15.04 \pm 0.38 | 15.91 \pm 0.47 | 16.56 \pm 0.61 | 17.12 \pm 0.54 |
| Σ PUFA (%) | 39.25 \pm 0.71 | 41.41 \pm 0.82 | 43.72 \pm 0.88 | 46.12 \pm 0.91 |

4.3.5.2. Composición por grupos de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos totales del tejido ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) mostró diferencias estacionales significativas (ANOVA, $p < 0.001$) para el contenido total ácidos grasos, siendo las puestas posteriores las que presentan un mayor contenido en ácidos grasos en las dos rías estudiadas, con valores medios de $167.7 \pm 2.90 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para la ría de Arousa y $160.9 \pm 3.84 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para la ría de A Coruña (Tablas 4.13 y 4.14). El contenido total de ácidos grasos por huevo individual presentó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) en la ría de A Coruña, con la misma tendencia de valores más elevados en las puestas posteriores ($14.0 \pm 0.33 \mu\text{g}/\text{huevo}$) del ciclo de cría (Tablas 4.13 y 4.14).

Analizando por grupo de ácidos grasos, en la composición del tejido ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) y por huevo individual se apreció que los ácidos grasos saturados fueron significativamente más altos (ANOVA, $p < 0.001$) en las primeras puestas del ciclo de cría en las dos rías, con valores medios de $47.0 \pm 1.13 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS y de $4.4 \pm 0.21 \mu\text{g}/\text{huevo}$ en la ría de Arousa y de $42.2 \pm 0.70 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS y de $3.9 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{huevo}$ en la ría de A Coruña (Fig. 4.10, Tablas 4.13 y 4.14).

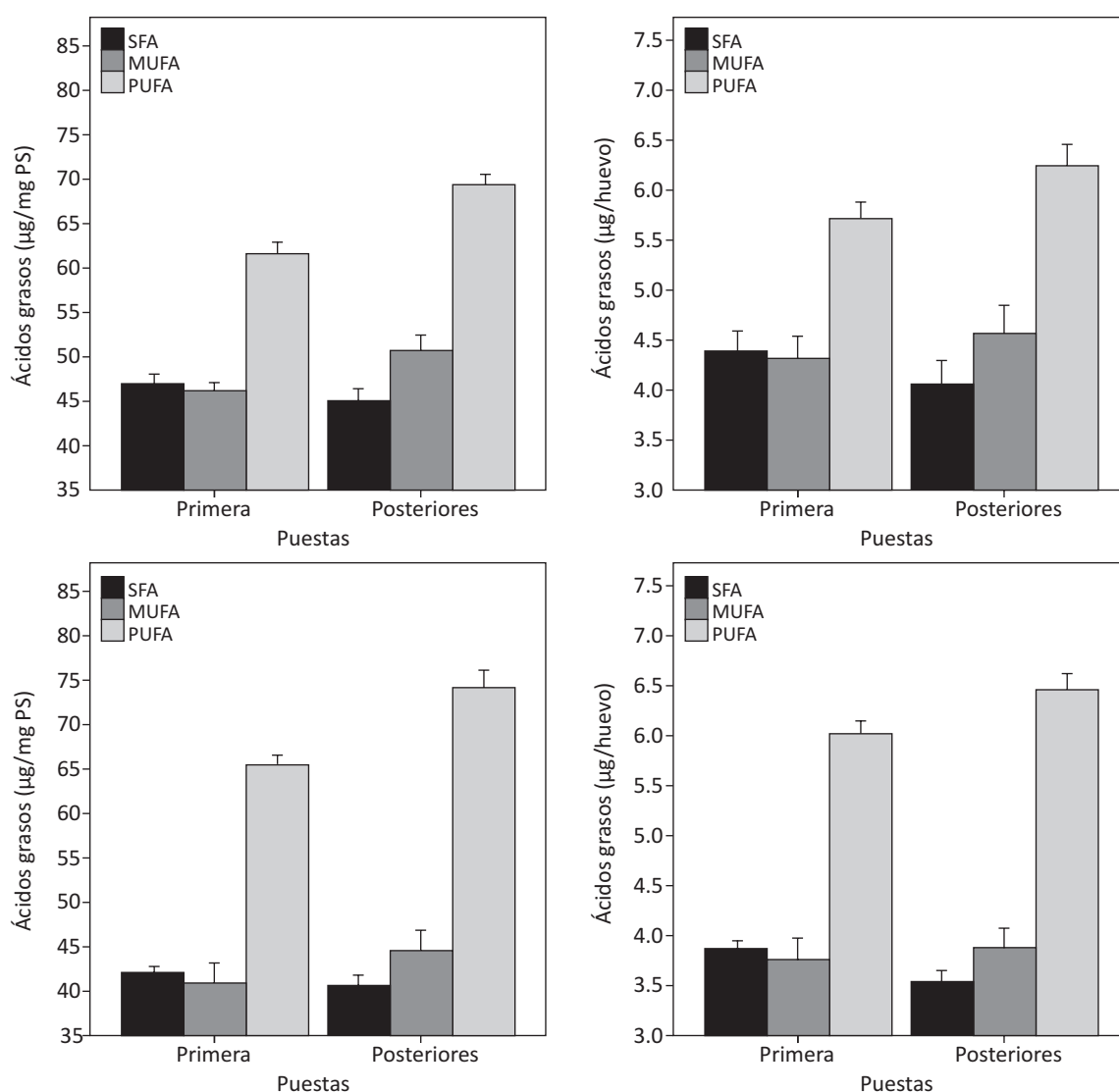


Fig. 4.10. Cambios en el contenido los principales grupos de ácidos grasos (SFA: ácidos grasos saturados, MUFA: ácidos grasos monoinsaturados, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados) de las puestas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) (izquierda) y de los huevos individuales (derecha) para el ciclo de cría de 1998 en la ría de Arousa (arriba) y para el ciclo de cría de 2003 en la ría de A Coruña (abajo).

En cambio, los monoinsaturados y los poliinsaturados fueron significativamente más abundantes (ANOVA, $p < 0.05$ para los MUFA por huevo de la ría de Arousa y $p < 0.001$ para el resto) en las posteriores puestas, tanto en la ría de Arousa ($50.7 \pm 1.83 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ y $4.6 \pm 0.29 \mu\text{g}/\text{huevo}$ para MUFA y $69.4 \pm 1.22 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ y $6.2 \pm 0.22 \mu\text{g}/\text{huevo}$ para PUFA) como en la ría de A Coruña ($44.6 \pm 2.41 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para MUFA y $74.20 \pm 2.07 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ y $6.5 \pm 0.17 \mu\text{g}/\text{huevo}$ para PUFA), a excepción de los MUFA por huevo en la ría de A Coruña que no presentaron diferencias significativas entre puestas.

4.3.5.3. Composición de los principales ácidos grasos

Para analizar las variaciones estacionales en el contenido de ácidos grasos individuales, se seleccionaron los principales ácidos grasos presentes en los huevos recién desovados, tanto de la ría de Arousa como de la ría de A Coruña. El criterio empleado fue la proporción frente al total de ácidos grasos, tomándose solamente aquellos que se encontraban en una proporción superior al 1% en al menos una de las dos áreas de estudio.

Los ácidos grasos seleccionados fueron: 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0 en el grupo de saturados, 16:1w7, 18:1w7, 18:1w9, 20:1w9 en el grupo de los monoinsaturados y 18:2w6, 18:3w3, 20:4w6, 20:5w3, 22:6w3 en el grupo de los poliinsaturados (Tablas 4.13 y 4.14).

4.3.5.3.1. Ácidos grasos saturados

En la ría de Arousa dentro de los ácidos grasos saturados se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre puesta, apreciándose un contenido de 14:0 y de 15:0 mayor en las puestas posteriores del ciclo y un contenido de 16:0 y de 18:0 más elevado en las primeras puestas tanto por tejido ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) como por huevo (Tabla 4.13).

En la ría de A Coruña, también se vieron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$ para 14:0 y $p < 0.001$ para el resto) entre puesta en los SFA por mg de tejido (Tabla 4.14). De tal manera que el contenido de 14:0, 15:0 y 18:0 fue superior en las puestas posteriores del ciclo de cría, mientras que el contenido de 16:0 fue mayor en las primeras puestas. Para el contenido de SFA por huevo, solamente el 16:0, cuyo contenido fue mayor en las primeras puestas ($2.5 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{huevo}$), y el 18:0, con un contenido más elevado en las puestas posteriores ($0.8 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{huevo}$), presentaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre puestas.

4.3.5.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados

En los ácidos grasos monoinsaturados principales se apreciaron diferencias significativas entre puestas, tanto por mg de tejido como por huevo, en la ría de Arousa (ANOVA, $p < 0.01$ por huevo para el 18:1w9 y $p < 0.001$ para el resto) y en la ría de A Coruña (ANOVA, $p < 0.05$ por huevo y por mg de tejido para el 20:1w9 y $p < 0.001$ para el resto) (Tablas 4.13 y 4.14). Se observaron dos tendencias opuestas entre los MUFA, el contenido de 16:1w7 fue más elevado en las primeras puestas ($13.8 \pm 0.68 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ y $1.3 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{huevo}$ en Arousa y $12.5 \pm 1.32 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ y $1.1 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{huevo}$ en A Coruña), mientras que el contenido de 18:1w7, de 18:1w9 y de 20:1w9 fue superior en las puestas posteriores (tanto por mg de tejido como por huevo) en las dos zonas de estudio.

4.3.5.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados

En la ría de Arousa el grupo de los ácidos grasos poliinsaturados presentó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.01$ para el 18:3w3 y $p < 0.001$ para el resto) entre puestas por mg de tejido, siendo el contenido de 18:3w3, 20:4w6, 20:5w3 y 22:6w3 mayor en las puestas posteriores del ciclo de cría (Tabla 4.13). El contenido de 18:2w6 del tejido no presentó diferencias significativas entre puestas.

En cuanto a su contenido por huevo, los ácidos grasos 20:4w6 y 22:6w3 presentaron valores significativamente (ANOVA, $p < 0.001$) mayores en las puestas posteriores del ciclo de cría. Por el contrario, en el contenido de 18:2w6 se apreció un patrón opuesto, siendo más elevado su contenido en las primeras puestas del ciclo de cría (ANOVA, $p < 0.01$). El contenido de los ácidos grasos 18:3w3 y 20:5w3 por huevo no mostró diferencias estacionales significativas.

En la ría de A Coruña también se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) por mg de tejido en el contenido de los PUFA 18:2w6, 18:3w3, 20:4w6, 20:5w3 y 22:6w3, encontrándose valores superiores en las puestas posteriores del ciclo de cría (2.8 ± 0.10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 18:2w6, 1.4 ± 0.07 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 18:3w3, 5.9 ± 0.53 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 20:4w6, 34.4 ± 1.58 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 20:5w3 y 27.5 ± 0.87 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 22:6w3) (Tabla 4.14).

Por otro lado, en el contenido por huevo de estos ácidos grasos solamente se observaron diferencias estacionales significativas (ANOVA, $p < 0.001$) en el contenido de 20:4w6 y de 22:6w3, siendo mayores sus valores en las puestas posteriores del ciclo de cría (0.5 ± 0.04 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 20:4w6 y 2.4 ± 0.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 22:6w3).

En cuanto a las relaciones w3/w6, 18:1w7/18:1w9, 20:5w3/20:4w6 y 20:5w3/22:6w3, se observaron diferencias significativas entre puestas en las dos zonas de estudio (ANOVA, $p < 0.05$ para la relación 20:5w3/22:6w3 en la ría de A Coruña y $p < 0.001$ para el resto, a excepción de la relación 18:1w7/18:1w9 en la ría de A Coruña que se mantuvo sin variaciones entre puestas (Tablas 4.13 y 4.14). La relación 18:1w7/18:1w9 en la ría de Arousa fue superior en las puestas posteriores (0.5 ± 0.03), mientras que el resto de las relaciones fueron más elevadas en la primera puesta tanto en la ría de Arousa como en la ría de A Coruña.

Tabla 4.13. Variaciones estacionales en el contenido de los principales ácidos grasos del tejido ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) y por huevo recién desovado de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar, el estadístico F y el nivel de significancia P. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Parámetros | Ría de Arousa (1998) | | | | | | | |
|----------------|-----------------------------|----------------------------|--------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------|--------|
| | Por mg de tejido (µg/mg PS) | | | Por huevo individual (µg/huevo) | | | | |
| | 1ª Puesta | Puestas posteriores | F | P | 1ª Puesta | Puestas posteriores | F | P |
| 14.0 | 4.07 ± 0.43 ^b | 5.93 ± 0.42 ^a | 146.40 | <0.001 | 0.38 ± 0.04 ^b | 0.53 ± 0.05 ^a | 89.23 | <0.001 |
| 15.0 | 1.69 ± 0.04 ^b | 1.97 ± 0.07 ^a | 186.60 | <0.001 | 0.16 ± 0.01 ^b | 0.18 ± 0.01 ^a | 34.19 | <0.001 |
| 16.0 | 31.44 ± 0.97 ^a | 28.83 ± 1.17 ^b | 43.48 | <0.001 | 2.94 ± 0.16 ^a | 2.60 ± 0.17 ^b | 32.03 | <0.001 |
| 18.0 | 8.86 ± 0.40 ^a | 7.29 ± 0.37 ^b | 126.10 | <0.001 | 0.83 ± 0.05 ^a | 0.66 ± 0.05 ^b | 81.77 | <0.001 |
| ΣSFA | 47.04 ± 1.12 ^a | 45.12 ± 1.42 ^b | 16.24 | <0.001 | 4.39 ± 0.21 ^a | 4.07 ± 0.25 ^b | 14.72 | <0.001 |
| 16:1w7 | 13.77 ± 0.68 ^a | 11.46 ± 1.24 ^b | 37.20 | <0.001 | 1.29 ± 0.09 ^a | 1.03 ± 0.13 ^b | 34.70 | <0.001 |
| 18:1w7 | 8.40 ± 0.56 ^b | 11.74 ± 0.74 ^a | 188.20 | <0.001 | 0.79 ± 0.07 ^b | 1.06 ± 0.09 ^a | 86.62 | <0.001 |
| 18:1w9 | 20.05 ± 0.63 ^b | 22.41 ± 0.71 ^a | 91.96 | <0.001 | 1.87 ± 0.11 ^b | 2.02 ± 0.11 ^a | 12.96 | <0.01 |
| 20:1w9 | 0.95 ± 0.21 ^b | 1.58 ± 0.47 ^a | 20.56 | <0.001 | 0.09 ± 0.02 ^b | 0.14 ± 0.04 ^a | 18.27 | <0.001 |
| ΣMUFA | 46.24 ± 0.96 ^b | 50.75 ± 1.83 ^a | 65.34 | <0.001 | 4.32 ± 0.24 ^b | 4.57 ± 0.29 ^a | 6.45 | <0.05 |
| 18:2w6 | 2.68 ± 0.08 ^a | 2.64 ± 0.07 ^a | 2.20 | 0.15 | 0.25 ± 0.01 ^a | 0.24 ± 0.01 ^b | 8.11 | <0.01 |
| 18:3w3 | 1.71 ± 0.07 ^b | 1.82 ± 0.09 ^a | 13.07 | <0.01 | 0.16 ± 0.01 ^a | 0.16 ± 0.01 ^a | 1.48 | 0.23 |
| 20:4w6 | 2.94 ± 0.12 ^b | 6.37 ± 0.58 ^a | 437.80 | <0.001 | 0.28 ± 0.02 ^b | 0.57 ± 0.06 ^a | 324.90 | <0.001 |
| 20:5w3 | 28.25 ± 0.80 ^b | 29.67 ± 0.56 ^a | 33.63 | <0.001 | 2.64 ± 0.13 ^a | 2.67 ± 0.11 ^a | 0.50 | 0.49 |
| 22:6w3 | 23.62 ± 0.67 ^b | 26.67 ± 0.74 ^a | 137.70 | <0.001 | 2.21 ± 0.10 ^b | 2.40 ± 0.08 ^a | 38.62 | <0.001 |
| ΣPUFA | 61.65 ± 1.37 ^b | 69.43 ± 1.22 ^a | 276.40 | <0.001 | 5.76 ± 0.24 ^b | 6.25 ± 0.22 ^a | 34.06 | <0.001 |
| Σ TOTALES | 157.06 ± 1.77 ^b | 167.70 ± 2.90 ^a | 137.30 | <0.001 | 14.68 ± 0.63 ^a | 15.10 ± 0.74 ^a | 2.88 | 0.10 |
| w3/w6 | 8.66 ± 0.35 ^a | 6.36 ± 0.46 ^b | 223.60 | <0.001 | | | | |
| 18:1w7/C18:1w9 | 0.42 ± 0.03 ^b | 0.52 ± 0.03 ^a | 95.47 | <0.001 | | | | |
| 20:5w3/C22:6w3 | 1.20 ± 0.04 ^a | 1.11 ± 0.03 ^b | 36.39 | <0.001 | | | | |
| 20:5w3/C20:4w6 | 9.64 ± 0.51 ^a | 4.69 ± 0.39 ^b | 932.30 | <0.001 | | | | |

Tabla 4.14. Variaciones estacionales en el contenido de los principales ácidos grasos del tejido ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) y por huevo recién desovado de *M. brachydactyla* en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar, el estadístico F y el nivel de significancia P. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Ría de A Coruña (2003) | | | | | | | | |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------|--------|---------------------------------|---------------------------|--------|--------|
| Parámetros | Por mg de tejido (µg/mg PS) | | | | Por huevo individual (µg/huevo) | | | |
| | 1ª Puesta | Puestas posteriores | F | P | 1ª Puesta | Puestas posteriores | F | P |
| 14.0 | 3.90 ± 0.48 ^b | 4.28 ± 0.45 ^a | 7.05 | <0.05 | 0.36 ± 0.04 ^a | 0.37 ± 0.04 ^a | 1.21 | 0.28 |
| 15.0 | 1.69 ± 0.04 ^b | 1.80 ± 0.03 ^a | 75.88 | <0.001 | 0.16 ± 0.01 ^a | 0.13 ± 0.06 ^a | 3.35 | 0.07 |
| 16.0 | 27.62 ± 0.69 ^a | 25.03 ± 0.91 ^b | 103.60 | <0.001 | 2.54 ± 0.07 ^a | 2.18 ± 0.08 ^b | 231.10 | <0.001 |
| 18.0 | 7.99 ± 0.22 ^b | 8.82 ± 0.27 ^a | 113.30 | <0.001 | 0.74 ± 0.02 ^b | 0.77 ± 0.03 ^a | 18.08 | <0.001 |
| ΣSFA | 42.16 ± 0.70 ^a | 40.68 ± 1.22 ^b | 22.04 | <0.001 | 3.88 ± 0.08 ^a | 3.54 ± 0.12 ^b | 112.00 | <0.001 |
| 16:1w7 | 12.47 ± 1.32 ^a | 10.10 ± 1.14 ^b | 38.95 | <0.001 | 1.15 ± 0.12 ^a | 0.88 ± 0.10 ^b | 60.29 | <0.001 |
| 18:1w7 | 7.42 ± 1.68 ^b | 9.45 ± 0.52 ^a | 30.30 | <0.001 | 0.68 ± 0.16 ^b | 0.82 ± 0.05 ^a | 16.68 | <0.001 |
| 18:1w9 | 17.98 ± 0.68 ^b | 21.06 ± 0.64 ^a | 228.50 | <0.001 | 1.65 ± 0.05 ^b | 1.84 ± 0.06 ^a | 105.20 | <0.001 |
| 20:1w9 | 0.78 ± 0.12 ^b | 1.69 ± 1.71 ^a | 5.29 | <0.05 | 0.07 ± 0.01 ^b | 0.15 ± 0.15 ^a | 5.00 | <0.05 |
| Σ MUFA | 40.96 ± 2.37 ^b | 44.61 ± 2.41 ^a | 24.17 | <0.001 | 3.77 ± 0.23 ^a | 3.89 ± 0.20 ^a | 3.32 | 0.08 |
| 18:2w6 | 2.72 ± 0.06 ^b | 2.84 ± 0.10 ^a | 24.59 | <0.001 | 0.25 ± 0.01 ^a | 0.25 ± 0.01 ^a | 0.61 | 0.44 |
| 18:3w3 | 1.28 ± 0.05 ^b | 1.40 ± 0.07 ^a | 39.65 | <0.001 | 0.10 ± 0.04 ^a | 0.11 ± 0.04 ^a | 0.40 | 0.53 |
| 20:4w6 | 3.00 ± 0.09 ^b | 5.89 ± 0.53 ^a | 553.10 | <0.001 | 0.28 ± 0.01 ^b | 0.51 ± 0.04 ^a | 526.80 | <0.001 |
| 20:5w3 | 32.35 ± 1.05 ^b | 34.44 ± 1.58 ^a | 24.23 | <0.001 | 2.97 ± 0.11 ^a | 3.00 ± 0.13 ^a | 0.51 | 0.48 |
| 22:6w3 | 24.82 ± 0.96 ^a | 27.54 ± 0.87 ^b | 92.93 | <0.001 | 2.28 ± 0.10 ^a | 2.40 ± 0.08 ^b | 18.39 | <0.001 |
| Σ PUFA | 65.52 ± 1.15 ^b | 74.20 ± 2.07 ^a | 265.60 | <0.001 | 6.02 ± 0.14 ^b | 6.46 ± 0.17 ^a | 82.34 | <0.001 |
| Σ TOTALES | 149.90 ± 2.88 ^b | 160.89 ± 3.84 ^a | 106.00 | <0.001 | 13.78 ± 0.33 ^b | 14.02 ± 0.33 ^a | 5.46 | <0.05 |
| w3/w6 | 9.57 ± 0.34 ^a | 6.68 ± 0.43 ^b | 565.30 | <0.001 | | | | |
| 18:1w7/C18:1w9 | 0.41 ± 0.09 ^a | 0.45 ± 0.03 ^a | 3.54 | 0.07 | | | | |
| 20:5w3/C22:6w3 | 1.31 ± 0.08 ^a | 1.25 ± 0.07 ^b | 5.55 | <0.05 | | | | |
| 20:5w3/C20:4w6 | 10.80 ± 0.53 ^a | 5.89 ± 0.57 ^b | 814.70 | <0.001 | | | | |

4.3.6. Composición de ácidos nucleicos

Para el estudio del contenido de los ácidos nucleicos en los huevos recién desovados de las dos zonas de estudio solamente se analizaron los años 1998 en la ría de Arousa y 2003 en la ría de A Coruña.

En la ría de Arousa se observaron diferencias estacionales significativas (ANOVA, $p < 0.001$) en el contenido de ADN y ARN del tejido ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS), observándose los mayores valores en las puestas posteriores ($0.17 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS de ADN y $1.52 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS de ARN) (Fig. 4.11, Tabla 4.15). En cuanto al contenido por huevo, solamente se observaron diferencias estacionales significativas (ANOVA, $p < 0.05$) en el contenido de ARN, siendo más elevado en los huevos de las puestas posteriores ($0.14 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{huevo}$ de ARN). En lo referente a la relación ARN/ADN, no se observaron diferencias estacionales significativas.

En la ría de A Coruña no se observaron diferencias estacionales significativas en el contenido de ADN y de ARN, tanto por mg de tejido como por huevo, ni en la relación ARN/ADN (Fig. 4.11, Tabla 4.15).

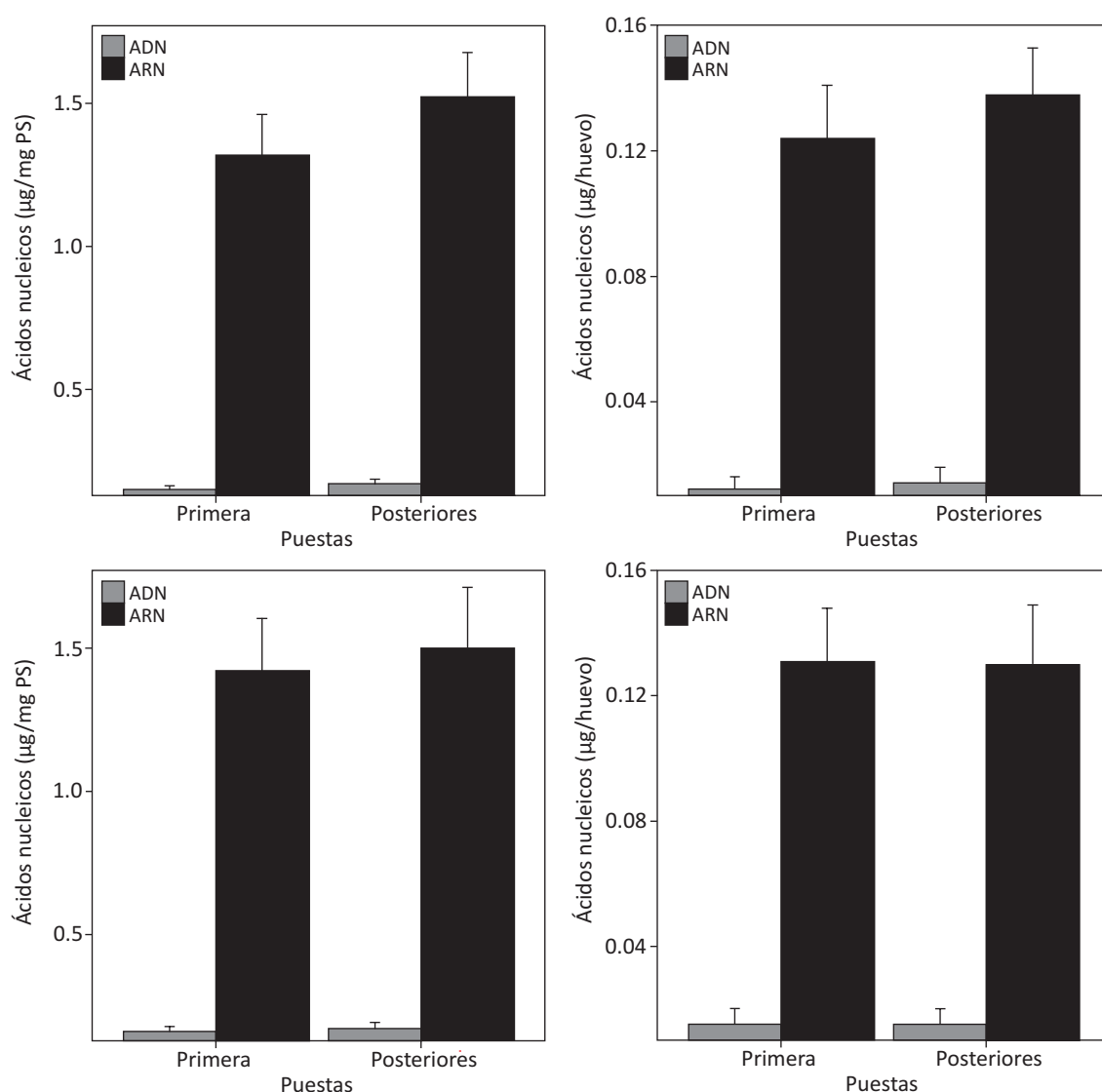


Fig. 4.11. Contenido de ácidos nucleicos (ADN: ácido desoxirribonucleico y ARN: ácido ribonucleico) de las puestas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) (izquierda) y de los huevos individuales (derecha) para los dos periodos de puesta en la ría de Arousa (arriba) y en la ría de A Coruña (abajo).

Tabla 4.15. Variaciones estacionales en el contenido en ácidos nucleicos (ADN y ARN) y en la relación ARN/ADN por mg de tejido (peso seco, PS), por porcentaje y por huevo recién desovado de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar, el estadístico F y el nivel de significancia P. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Ría de Arousa (1998) | | | | |
|------------------------------------|-------------------|---------------------|-------|--------|
| Parámetros | 1ª Puesta | Puestas posteriores | F | P |
| ADN ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 0.15 ± 0.01^b | 0.17 ± 0.02^a | 14.00 | <0.001 |
| ARN ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 1.32 ± 0.14^b | 1.52 ± 0.16^a | 13.97 | <0.001 |
| ARN/ADN | 8.73 ± 0.41^a | 8.92 ± 0.54^a | 1.12 | 0.30 |
| ADN ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 0.01 ± 0.01^a | 0.01 ± 0.01^a | 1.48 | 0.23 |
| ARN ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 0.12 ± 0.02^b | 0.14 ± 0.02^a | 6.24 | <0.05 |
| ADN (% PS) | 0.015 ± 0.001 | 0.017 ± 0.002 | | |
| ARN (% PS) | 0.132 ± 0.014 | 0.152 ± 0.015 | | |
| Ría de A Coruña (2003) | | | | |
| Parámetros | 1ª Puesta | Puestas posteriores | F | p |
| ADN ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 0.16 ± 0.02^a | 0.17 ± 0.02^a | 2.59 | 0.12 |
| ARN ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | 1.42 ± 0.18^a | 1.50 ± 0.22^a | 1.45 | 0.24 |
| ARN/ADN | 8.75 ± 0.30^a | 8.66 ± 0.64^a | 0.33 | 0.57 |
| ADN ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 0.02 ± 0.01^a | 0.02 ± 0.01^a | 0.09 | 0.76 |
| ARN ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) | 0.13 ± 0.02^a | 0.13 ± 0.02^a | 0.01 | 0.91 |
| ADN (% PS) | 0.016 ± 0.002 | 0.017 ± 0.002 | | |
| ARN (% PS) | 0.142 ± 0.018 | 0.150 ± 0.021 | | |

4.4. DISCUSIÓN

4.4.1. Características biométricas del embrión

El volumen medio de los huevos recién puestos de *M. brachydactyla* observado durante este estudio fue menor que el obtenido en el estudio de fecundidad (tercer capítulo). Esto puede deberse a que en el estudio anterior se emplearon huevos en estado I (según la clasificación de González-Gurriarán *et al.*, 1993) sin distinguir su grado de desarrollo dentro de este estado. Por su parte, este estudio se limitó a los huevos recién desovados, que se encontraban en una fase inicial de desarrollo, para poder caracterizar la calidad inicial del huevo de la forma más precisa posible. Por lo tanto, estos huevos presentaban un volumen menor. Sin embargo, esta misma variación no afectó al peso seco medio del huevo.

El diámetro medio de los huevos recién puestos en Galicia (708-715 μm) fue similar al observado en otras latitudes para esta especie (Lang, 1973; Brosnan, 1981; Figueiredo & Narciso, 2008; Duran *et al.*, 2011) y superior al de otros Majoideos (Moriyasu & Lanteigne, 1998; López Greco *et al.*, 2000; Hernández-Reyes *et al.*, 2001; Okamori & Cobo 2003; Cobo & Okamori, 2008; Varisco & Vinuesa, 2011). A pesar de ello, se han constado variaciones espaciales que podrían estar relacionadas con las diferencias en las condiciones ambientales entre la ría de A Coruña y la ría de Arousa. Esto se ha visto en otras especies de braquiuros donde el tamaño de los huevos parece estar correlacionado con las oscilaciones en los factores ambientales tales como la temperatura (Jones & Simons, 1983; Kobayashi & Matsuura, 1995; Brante *et al.*, 2003), la disponibilidad de nutrientes (Simons & Jones, 1981) o la profundidad (Thessalou-Legaki, 1992; Bertram & Strathmann, 1998).

En cuanto a las variaciones estacionales, los resultados de este estudio coinciden con las observaciones del capítulo anterior. En este caso, la tendencia de huevos de mayor tamaño en las primeras puestas se mantuvo para todos los años y zonas, siendo además significativa para todas las variables biométricas. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que las variables biométricas reflejan las dos estrategias reproductivas diferentes según la época del año, como ya se ha observado en otras especies de la superfamilia Majoidea (Sainte-Marie, 1993; Yoshio, 2000) y otros crustáceos decápodos (Amsler & George, 1984; Fonseca-Larios & Briones-Fourzan, 1998; Bas *et al.*, 2007; Urzúa *et al.*, 2012). Un mayor tamaño relativo de huevos puede traducirse en un mayor tamaño de la larva recién eclosionada (Steele & Steele, 1975; Gimenez & Anger, 2001; Moland *et al.*, 2010). Se considera que las larvas grandes están mejor preparadas para la supervivencia en condiciones variables como la predación, la inanición o la salinidad (Steele & Steele, 1975; Shakuntala & Ravichandran, 1982; Morgan, 1995; Schuh & Diesel, 1995; Pollock, 1997; Hancock *et al.*, 1998). Por lo tanto, las larvas procedentes de puestas de invierno estarían mejor preparadas para sobrevivir en las condiciones desfavorables características de dicha estación, estrategia que ya se ha observado en larvas de otros crustáceos decápodos (Paschke *et al.*, 2004; Urzúa & Anger, 2012).

No obstante, algunos autores sugieren que el empleo de un único parámetro, como el tamaño o el peso del huevo, no es adecuado para estimar la calidad, ya que no siempre existe una correlación entre los distintos parámetros de calidad (Anger & Harms, 1990; Jaekle, 1995; Marshall & Keough, 2008). Por lo tanto, es necesario cuantificar múltiples parámetros para poder tener una estima más precisa de la calidad del huevo.

4.4.2. Composición básica de la puesta

El agua es el componente más abundante en los huevos de crustáceos. Así, los huevos de las especies bentónicas con larvas pelágicas tiene un contenido en agua de aproximadamente 60% al comienzo del desarrollo, mientras que en los huevos de especies pelágicas con larvas pelágicas, el contenido en agua es superior, entorno al 91% (Pandian, 1970). El contenido de agua observado en los huevos fecundados de *Maja brachydactyla* es similar al de otras especies de crustáceos decápodos, como *Alpheus saxidomus* (Wehrtmann & Graeve, 1998), *Callinectes sapidus* (Amsler & George, 1984), *Homarus gammarus* (Pandian, 1970), *Hyas araneus* (Petersen & Anger, 1997), *Pseudocarcinus gigas* (Gardner, 2001), *Uca rapax* (Figueiredo *et al.*, 2008b) cuya oscilación se situó entre el 51% y el 61% al inicio del desarrollo embrionario, e inferior al de otras especies como *Armases cinereum* (68.64%; Figueiredo *et al.*, 2008a), *Portunus pelagicus* (73.5%, Hamid *et al.*, 2015), *Scylla paramamosain* (81.9%; Djunaidah *et al.*, 2003) o *Farfantepenaeus paulensis* (83%; Lemos & Phan, 2001). Estas variaciones interespecíficas en el contenido de agua en los huevos al inicio del desarrollo pueden estar relacionadas con el tiempo transcurrido desde el desove.

La materia orgánica es el segundo componente cuantitativamente más importante, con porcentajes entre el 37% y el 44.6% para el resto de especies al inicio de su desarrollo, seguido del contenido en cenizas con un rango entre el 3.3% y el 6.7%. El contenido de ambas fracciones en huevos de centolla fue ligeramente inferior al rango observado en crustáceos decápodos, con un 36% y un 2.5% respectivamente.

Las diferencias estacionales observadas en el contenido de materia orgánica por huevo, con mayores valores en las primeras puestas, parecen coherentes con la hipótesis de que las puestas de invierno reciben una mayor inversión por huevo individual. Esto coincide con lo observado en otras especies de crustáceos decápodos, como *Crangon crangon* (Paschke, 1998), donde los huevos de invierno resultaron ser más ricos en materia orgánica que los de verano. Por su parte, el contenido de materia orgánica por mg de tejido fue superior también en las primeras puestas. No obstante, el mayor peso total de las puestas posteriores, como se observó en el capítulo anterior, indica que la inversión total en la puesta en cuanto a materia orgánica es mayor en las puestas posteriores, lo que concuerda con la estrategia observada de mayor inversión por huevo en las primeras puestas y mayor inversión por puesta en las puestas posteriores.

4.4.3. Composición bioquímica de la puesta

En los huevos recién desovados de *M. brachydactyla* se observó que la proporción de carbono (48.5%-54.3%) fue similar a los valores observados en otros crustáceos decápodos (Clarke, 1993a; Petersen & Anger, 1997; Nates & McKenney, 2000; Anger & Moreira, 2004; Bas *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2009; Urzúa *et al.*, 2012; Webb *et al.*, 2012; Swiney *et al.*, 2013). Mientras que, los valores de la relación C/N (4.40-4.90) fueron similares (Urzúa *et al.*, 2012) o algo inferiores a los encontrados en otros crustáceos decápodos (Petersen & Anger, 1997; Nates & McKenney, 2000; Bas *et al.*, 2007).

Al igual que en otros crustáceos decápodos, en la fracción orgánica de los huevos iniciales de centolla las proteínas son el componente mayoritario del vitelo, seguidas por los lípidos y en menor proporción los carbohidratos (p.ej.: Holland, 1978; Amsler & George, 1984; Sasaki *et al.*, 1986; Anger & Harms, 1990; Harrison, 1990; Petersen & Anger, 1997; Djunaidah *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2005; Dinakaran & Soundarapandian, 2009; Urzúa *et al.*, 2012; Soundarapandian *et al.*, 2013a y b). El contenido proteico del vitelo fue de un 62.1% y un 65.4%, valor ligeramente inferior al rango observado en otros crustáceos decápodos (Djunaidah *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 2003; Urzúa *et al.*, 2012; Soundarapandian *et al.*, 2013a y b). Por el contrario, el contenido lipídico, que en centolla se encuentra

en torno al 22.7%-26.1%, presenta diferencias entre crustáceos decápodos, encontrándose valores inferiores (Morais *et al.*, 2002; Djunaidah *et al.*, 2003; Graeve & Wehrtmann, 2003; Urzúa *et al.*, 2012; Soundarapandian *et al.*, 2013a y b), superiores (Nates & Mckenney, 2000; Wu *et al.*, 2007a; Sui *et al.*, 2009) o similares (Lemos & Phan, 2001; Jacobs *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2005). En lo que respecta a los carbohidratos, su contenido (4.4%-6.2%) fue similar a otros crustáceos decápodos (Jacobs *et al.*, 2003; Soundarapandian *et al.*, 2013b) o incluso superior (Biesiot & Perry, 1995; Lemos & Phan, 2001). Los valores de la relación lípidos/proteínas (0.36-0.40) fueron inferiores a lo observado en otras especies como *Farfantepenaeus paulensis* (Lemos & Phan, 2001) o *Hyas araneus* (Petersen & Anger, 1997).

El contenido energético de los huevos recién desovados por mg de tejido en términos de energía^s (22.30-25.0 J/mg) fue similar al rango observado en otras especies de crustáceos decápodos como *Crangon crangon* (23.2 J/mg; Urzúa *et al.*, 2012), *Chasmagnathus granulatus* (24.58 J/mg; Bas *et al.*, 2007), *Hyas coarctatus* (25.4 J/mg; Bryant & Hartnoll, 1995) o *Inachus dorsettensis* (23.3 J/mg; Bryant & Hartnoll, 1995), mientras que en valores de energía^w (24.5-26.7 J/mg), fue ligeramente superior al contenido energético observado en *Crangon crangon* (21.4 J/mg; Urzúa *et al.*, 2012) o *Farfantepenaeus paulensis* (22 J/mg; Lemos & Phan, 2001). El sesgo observado entre los dos estimadores de energía, con estimas más elevadas de energía a partir de la composición bioquímica de lípidos, proteínas y carbohidratos (energía^w), concuerda con lo visto en otros crustáceos decápodos, donde las estimas de energía basadas en carbono subestiman el contenido energético real del tejido (Anger & Dawirs, 1982; Anger, 2001; Urzúa *et al.*, 2012).

Las diferencias estacionales encontradas en la composición bioquímica (carbono, lípidos, proteínas y carbohidratos) de los huevos individuales de centolla indican un mayor contenido por huevo al comienzo del ciclo de cría, momento en el que las hembras llevan a cabo su primera puesta y, en relación con ello, una mayor cantidad de energía por huevo. Los huevos recién desovados contienen la energía necesaria para el desarrollo embrionario (Jaekle, 1995) y por tanto, la biomasa de larvas recién eclosionadas dependerán de esas reservas iniciales de energía y de su posterior consumo durante la embriogénesis (Anger, 2001). Como consecuencia de la mayor cantidad de lípidos y proteínas de los huevos de las primeras puestas de *M. brachydactyla*, las larvas plantónicas que surgen tras la eclosión podrían disponer de mayores reservas energéticas y tener mayores posibilidades de sobrevivir en condiciones adversas (Anger, 2001; Gardner, 2001; Giménez & Anger, 2005; Gebauer *et al.*, 2010). Algunos estudios realizados con especies con desarrollo larvario plantónico sugieren que este efecto se puede prolongar hasta las fases tempranas de juveniles (Giménez *et al.*, 2004; Bas *et al.*, 2008; Koopman & Siders, 2013).

Estas variaciones estacionales en la composición bioquímica y en la energía por huevo se han encontrado en otros crustáceos decápodos (Boddeke, 1982; Amsler & George, 1984; Bas *et al.*, 2007; Urzúa *et al.*, 2012), observándose mayores valores también al comienzo del ciclo de cría. Esto es coherente con el mayor tamaño del huevo observado en estas puestas, ya que los huevos más grandes tienen un contenido relativamente alto de lípidos y una baja densidad comparados con los más pequeños (Herring, 1974; Salmon & Kettler, 1987). Además en algunos estudios se ha observado que las larvas provenientes de huevos grandes de invierno presentan mayores valores absolutos de carbono y energía que las larvas de huevos pequeños de verano (Bas *et al.*, 2007; Urzúa & Anger, 2012).

El contenido por mg de tejido de la composición bioquímica y de la energía (energía^s y energía^w) de las puestas de *M. brachydactyla* es mayor en las puestas posteriores, que tienen lugar en condiciones ambientales más favorables. Esto indicaría que, si bien en las primeras puestas la hembra invierte más energía por huevo individual, la inversión total es mayor en las puestas posteriores. Esto puede estar relacionado con la mayor disponibilidad de alimento para las hembras en esta época, que les permitiría disponer de más energía para invertir (Harrison, 1990). Asimismo, al tratarse de hembras primíparas que han realizado a finales de verano su muda terminal (Corgos *et al.*, 2006), es posible que su condición

fisiológica durante la primera puesta no sea óptima, lo que podría influir también en la inversión total realizada. Esto se observó anteriormente en *Chionoecetes opilio* y *Chionoecetes bairdi*, cuyas hembras múltiparas invierten más energía en la reproducción (Webb *et al.*, 2012; Swiney *et al.*, 2013), así como en *Inachus dorsettensis*, cuya primera puesta tiene lugar después de la muda terminal y es típicamente de menor tamaño que las posteriores (Bryant & Hartnoll, 1995).

En este estudio se ha observado una tendencia en la relación C/N opuesta a la generalmente observada en la literatura. Mientras que en otras especies de crustáceos decápodos la relación es mayor al principio del ciclo de cría (Anger, 2001; Giménez & Anger, 2005; Gebauer *et al.*, 2010), en centolla este valor ha sido mayor para las puestas posteriores. Sin embargo, las puestas posteriores son las que muestran una menor calidad por huevo individual, atendiendo a su menor contenido de carbono y energía. Por lo tanto, a pesar de que se suele relacionar la relación C/N con una mejor calidad de los embriones y de las larvas resultantes (Anger, 2001; Giménez & Anger, 2005; Gebauer *et al.*, 2010), estos resultados no reflejan dicha relación. Por el contrario, la relación C/N sí que podría estar relacionada con la calidad del tejido, medida como contenido elemental y energético por mg de tejido, que fue mayor en las puestas posteriores.

Las variaciones interanuales observadas en la composición bioquímica por mg de tejido podrían reflejar cambios en la inversión de la hembra en la puesta como consecuencia de las oscilaciones anuales en las condiciones ambientales y oceanográficas, especialmente en cuanto a la frecuencia e intensidad de los fenómenos de afloramiento que determinan la productividad biológica de sus aguas cada año (Gómez-Gesteira, 2010).

Las diferencias espaciales encontradas en la composición bioquímica y en la energía de los huevos de *M. brachydactyla* se han observado también en otras especies de braquiuros como *Cancer setosus* (Fischer *et al.*, 2009) y *Cancer granulatus* (Bas *et al.*, 2007), en las que se relacionan con diferentes parámetros ambientales y oceanográficos. Se ha visto que la centolla presenta una mayor calidad de las puestas, tanto a nivel de huevo como de mg de tejido, en la ría de Arousa, lo que podría estar relacionado, al igual que en la variabilidad interanual, con diferencias en factores ambientales y en la disponibilidad de alimento en esta zona con respecto a la ría de A Coruña. Es sabido que la productividad biológica de las Rías Bajas (como la ría de Arousa) es superior a la de las Rías Altas (como la de A Coruña) debido a las diferencias en duración, frecuencia e intensidad de los fenómenos de afloramiento. Así, mientras en las Rías Bajas la probabilidad de ocurrencia de eventos de afloramiento está en torno a un 60%, en las Rías Altas no supera el 30%. Además, los afloramientos en las Rías Bajas tienen lugar durante un período más amplio (de marzo a septiembre) que en las Rías Altas, donde se limitan al período de junio a agosto (Gómez-Gesteira *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2008a; Gómez-Gesteira, 2010).

Las diferencias encontradas en la composición bioquímica de los huevos pueden tener implicaciones para el desarrollo embrionario y larvario. Los lípidos constituyen la principal fuente de energía, además de jugar un importante papel estructural, fundamentalmente como constituyentes de las membranas celulares (Arts *et al.*, 2001). Por su parte, las proteínas tienen una función esencialmente estructural, aunque en menor medida también son fuente de energía. Por último, los carbohidratos aunque son el componente minoritario tiene un papel metabólico importante en el almacenaje de glucógeno, la síntesis de quitina y la formación de ácidos grasos (New, 1976). Por tanto, los huevos con mayor contenido en estas fracciones deberían tener una mayor calidad, lo que supondría ventajas para su desarrollo y supervivencia en condiciones ambientales variables.

Los dos métodos empleados para determinar la composición bioquímica de los huevos de *M. brachydactyla*, en términos de mg de tejido o huevo individual, muestran una alta correlación entre el contenido de carbono y de lípidos, observándose las mismas tendencias para las dos variables entre

puestas. Esto podría indicar que los análisis elementales de carbono pueden ser empleados como estimadores indirectos de la composición de lípidos, como se ha visto en otros crustáceos decápodos (Urzúa *et al.*, 2012).

4.4.4. Composición de clases de lípidos.

De las clases de lípidos analizadas en los huevos de *M. brachydactyla*, los fosfolípidos (45.8%-56.2%) y los neutrolípidos (37.1%-43.5%) son los que se encontraron en mayor proporción, mientras que los glucolípidos, fueron los componentes minoritarios (4.9%-14.7%). En general, la predominancia de una clase u otra de lípidos varía entre especies. Así, en muchas especies de crustáceos decápodos los neutrolípidos han sido claramente superiores en proporción que los fosfolípidos (Herring, 1973; Herring & Morris, 1975; Clarke *et al.*, 1990; Palacios *et al.*, 2001; Morais *et al.*, 2002; Jun-jie *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007a; Sui *et al.*, 2009), mientras que en otras ocurre lo contrario, siendo los fosfolípidos los que han mostrado mayor proporción (Clarke, 1977; Wehrtmann & Graeve, 1998; Nates & McKenney, 2000). En centolla, las diferencias entre fosfolípidos y neutrolípidos fueron mucho menores que en otros crustáceos decápodos; un ejemplo extremo es *Lepidophthalmus louisianensis* (Thalassinidea: Callinassidae), donde la proporción de fosfolípidos llegó a un 80.8% mientras que la de neutrolípidos se mantuvo en un 16.0% (Nates & McKenney, 2000).

En *M. brachydactyla*, el contenido de las distintas fracciones por huevo mostraron patrones estacionales diferentes. Así, los neutrolípidos mostraron valores mayores en las primeras puestas sólo para la ría de A Coruña. Por su parte, en ambas zonas los glucolípidos mostraron valores más elevados en las primeras puestas y los fosfolípidos aparecieron en mayor cantidad en las posteriores. La misma tendencia se observó para fosfolípidos por mg de tejido, de forma coincidente con lo observado para larvas de esta misma especie por Andrés *et al.* (2010a). Esta variabilidad puede deberse, por un lado, a las oscilaciones en diversos parámetros ambientales bióticos y abióticos; y, por otro, a diferencias estacionales en la composición de la dieta de las hembras. Cahu *et al.* (1994) observaron que los niveles de fosfolípidos en la dieta de las hembras de *Lithopenaeus vannamei* se relacionan con su concentración en los huevos. En algunas especies de krill se ha observado que variaciones en la disponibilidad de alimento y en parámetros ambientales como la temperatura y la salinidad influyen en la cantidad de fosfolípidos de las membranas celulares (Hagen *et al.*, 1996; Mayzaud *et al.*, 1999; Albessard & Mayzaud, 2003). También el nivel de neutrolípidos puede verse afectado por cambios en la dieta o por períodos de inanición (McConaughy, 1985; Staton & Sulkin, 1991; Schuh & Diesel, 1995).

A su vez, estas diferencias podrían tener implicaciones para el desarrollo de los huevos y de las larvas resultantes, ya que las distintas fracciones lipídicas juegan importantes papeles metabólicos y fisiológicos. En larvas de crustáceos, constituyen componentes nutricionales críticos que afectan al crecimiento, estado fisiológico y supervivencia larvaria (Anger, 1998; Ritar *et al.*, 2003; Liddy *et al.*, 2005; Holme *et al.*, 2007; Sui *et al.*, 2007; Limbourn & Nichols, 2009).

Los neutrolípidos, fundamentalmente los triacilglicéridos y las ceras, son considerados la principal fuente de reserva de lípidos en organismos marinos (Teshima *et al.*, 1977; Falk-Petersen *et al.*, 1981; Sargent & Falk-Petersen, 1981; Saether *et al.*, 1986; Clarke *et al.*, 1989; Virtue *et al.*, 1993; Kattner *et al.*, 1994; Hagen *et al.*, 1996; Mayzaud *et al.*, 1999; Wouters *et al.*, 1999; Albessard *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006; Haché *et al.*, 2015). Debido a esta función de reserva, son típicos de larvas lecitotróficas, mientras que las especies con larvas planctotróficas suelen presentar una menor proporción (Clarke, 1977, 1979, 1993; Kattner *et al.*, 1994; Wehrtmann & Graeve, 1998; Graeve & Wehrtmann, 2003). Su cantidad se relaciona con la calidad larvaria (Andrés *et al.*, 2010a) y se ha visto que su contenido inicial en huevos no se limita al desarrollo embrionario, sino que también influye en estadios posteriores (Fraser, 1989; Ouellet *et al.*, 1992). Así, en *Penaeus vannamei*, se observó que la supervivencia larvaria y la tolerancia

de los juveniles a condiciones adversas se ven afectadas por los bajos contenidos de triacilglicéridos en huevos (Palacios *et al.*, 2001). En *Homarus gammarus*, altos contenidos de triglicéridos en larvas se han asociado a una mayor supervivencia al estrés por salinidad, contaminación o inanición (Wickins *et al.*, 1995).

Por todo ello, la mayor presencia de esta clase de lípidos en huevos de las puestas invernales puede indicar que cuentan con una mayor reserva energética. El patrón estacional seguido por los rasgos bioenergéticos ha sido observado ya en otras especies de crustáceos. Este patrón podría optimizar la supervivencia y crecimiento larvario en condiciones variables de temperatura ambiental (Hadfield & Strathmann, 1996). Se ha sugerido que las hembras de algunas especies pueden emplear variables como el fotoperiodo o la temperatura como señales medioambientales para ajustar su inversión reproductiva a las condiciones en que previsiblemente se desarrollará su descendencia (Fischer *et al.*, 2009; Urzúa *et al.*, 2012).

Por su parte, los fosfolípidos y glucolípidos cumplen un papel estructural, fundamentalmente como componentes de la membrana celular, a la que confieren funcionalidad y fluidez. Los fosfolípidos también favorecen la absorción de los ácidos grasos, además de contribuir al transporte de componentes, intervenir en rutas metabólicas, y formar parte constituyente de las lipoproteínas (Coutteau *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1999; Copeman *et al.*, 2002; González-Félix & Pérez-Velázquez, 2002; Li *et al.*, 2014). A consecuencia de estas funciones, juegan un importante papel en las adaptaciones a condiciones ambientales como la temperatura (Hazel & Williams, 1990; Ladhes *et al.*, 2010) y como fuente de energía, fundamentalmente durante periodos de inanición, en crustáceos decápodos (Storch & Anger, 1983; Chandumpai *et al.*, 1991; Jones & Obst, 2000).

En la mayoría de crustáceos, los fosfolípidos constituyen un nutriente importante ya que, aunque pueden ser biosintetizados, su capacidad de síntesis no es suficiente para cubrir los requerimientos metabólicos (Shieh, 1969; Teshima & Kanazawa, 1979; Kanazawa *et al.*, 1985). Estos requerimientos de fosfolípidos en la dieta han sido ampliamente caracterizados en diversas especies de crustáceos decápodos (Conklin *et al.*, 1980; Briggs *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1993; Coutteau *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1998; Paibulkichakul *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 2000a; Gong *et al.*, 2000b; Wang *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010b; Wu *et al.*, 2011).

Procesos como la reproducción y el desarrollo embrionario y larvario se ven afectados por la disponibilidad de fosfolípidos en la dieta. Esto se ha observado para parámetros reproductivos como la fecundidad y las tasas de fertilización y supervivencia de los huevos (Millamena *et al.*, 1986; Bray *et al.*, 1990; Cahu *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994a; Cavalli *et al.*, 1999; Cuzin-Roudy *et al.*, 1999; Albessard *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2007a; Sui *et al.*, 2009). En particular, para larvas de crustáceos decápodos se han asociado a una mayor calidad larvaria (Coutteau *et al.*, 1997), a una mayor tasa de crecimiento (Kanazawa *et al.*, 1985) y a una mayor supervivencia y viabilidad de las larvas (Conklin *et al.*, 1980; D'Abramo *et al.*, 1981; Harrison, 1990; Coutteau *et al.*, 1997).

El mayor contenido en fosfolípidos encontrado en las puestas posteriores puede estar relacionado con la mayor disponibilidad de alimento para las hembras durante primavera y verano, lo que les permitiría proporcionar una composición lipídica más rica a los huevos.

Por otra parte, las diferencias observadas entre puestas de distintas estaciones podría sugerir que las dos estrategias reproductivas presentan una mayor complejidad que la sugerida por el análisis de la composición bioquímica. Así, mientras que en el apartado anterior se concluye que los huevos de las primeras puestas presentan una mayor calidad en términos de contenido lipídico, el análisis de las fracciones por separado indica que los huevos de las distintas épocas cuentan con ventajas diferenciadas. Esto podría suponer una adaptación a las condiciones concretas en las que se va a

producir el desarrollo larvario ya que los huevos de invierno dispondrían de mayores reservas energéticas para soportar las condiciones adversas tras la eclosión, mientras que los de verano contarían con un mayor aporte de nutrientes esenciales que contribuyen favorablemente a su supervivencia y crecimiento.

4.4.5. Composición de ácidos grasos

4.4.5.1. Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos (número y tipo) presentes en los huevos iniciales de *Maja brachydactyla* consta de un número total de ácidos grasos superior al encontrado en otras especies de crustáceos decápodos como *Macrobrachium idea* (23 ácidos grasos, Soundarapandian *et al.*, 2013a), *Callinectes sapidus* (26 ácidos grasos, Li *et al.*, 2012), *Portunus pelagicus* (29 ácidos grasos, Hamid *et al.*, 2015) o *Palaemon serratus* (31 ácidos grasos, Narciso & Morais, 2001), y similar al de otras especies como varias del género *Uca*: *U. annulipes*, *U. inversa*, *U. urvillei*, *U. chlorophthalmus*, *U. vocans* (37 ácidos grasos, Torres *et al.*, 2008) o *Nephrops norvegicus* (36 ácidos grasos, Rosa *et al.*, 2003) con algunas variaciones intra e interespecíficas en función del hábitat y de la dieta de los adultos (Cahu & Fauvel, 1986; Wehrtmann & Kattner, 1998; Rosa *et al.*, 2007).

Los ácidos grasos dominantes se mantienen relativamente constantes entre especies de crustáceos decápodos, siendo los principales el palmítico (16:0), el esteárico (18:0), el palmitoleico (16:1w7), el vaccénico (18:1w7), el oleico (18:1w9), el araquidónico (20:4w6), el eicosapentaenoico (20:5w3) y el docosahexaenoico (22:6w3) (Samuel *et al.*, 1998; Rosa *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012; Soundarapandian *et al.*, 2013a y b). Esto se cumple también para huevos de *Maja brachydactyla*, tanto en este estudio como en el de Figueiredo & Narciso (2008). Las diferencias entre los perfiles de las distintas especies se limitan, por lo general, a aquellos ácidos grasos que aparecen en bajas proporciones (menor al 2%).

El perfil obtenido para esta especie en Galicia es similar al de otras latitudes como Portugal (Figueiredo & Narciso, 2008) aunque el de Portugal es ligeramente mayor en número de ácidos grasos (44 ácidos grasos). Entre las variaciones observadas, nos encontramos la ausencia en Galicia de catorce ácidos grasos (17:0, 16:1w9, 18:1w5, 19:1w8, 19:1w10, 20:1w7, 20:1w5, 22:1w11, 22:1w7, 16:4w3, 18:4w3, 21:5w3, 22:4w6, 22:5w6) y, por otro lado, la aparición de once nuevos ácidos grasos (21:0, 23:0, 20:1w14, 20:1w15, 23:1w9, 24:1w9, 18:3w6, 20:2w9,15, 20:2w6,15, 20:2w6, 22:2w6). Estas diferencias podrían ser un reflejo de la distinta composición de la dieta en cada zona geográfica.

Dentro de Galicia, en las dos rías estudiadas hay pequeñas variaciones en el perfil de ácidos grasos debidas a la ausencia del 20:0, 23:0 y 18:3w6 en la ría de Arousa y del 23:1w9 en la ría de A Coruña. Comparando entre puestas, se observó la ausencia del 22:1w9, 24:1w9, 20:3w3, 22:2w6 en las primeras puestas en la ría de A Coruña. Cabe destacar que estos ácidos grasos de presencia variable entre puestas no son importantes en términos de la proporción que representan dentro del total de ácidos grasos presentes en los huevos.

Las diferencias en el perfil de ácidos grasos entre zonas y entre épocas del año pueden estar influenciadas por los cambios en la composición de la dieta de las hembras de centolla a lo largo del ciclo de cría anual, provocados por las condiciones ambientales (Bernárdez *et al.*, 2000). Se ha visto que en crustáceos decápodos, la composición de ácidos grasos varía con el hábitat y la época del año, y refleja las diferencias en la dieta (Barrento *et al.*, 2009b; Jiang *et al.*, 2014). Esto último ha sido corroborado por múltiples experiencias de cultivo en las que se han suministrado diferentes dietas (Lim *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2007; Unnikrishnan *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2015; Harhoglu *et al.*, 2015). En algunas especies de crustáceos, la composición de los principales ácidos grasos en adultos se correlacionó con la

composición de los huevos y de las larvas (Ward *et al.*, 1979), de modo que las variaciones en la dieta pueden resultar en variaciones bioquímicas en las puestas (Pochelon, 2011). En huevos de crustáceos decápodos, el contenido en ácidos grasos también varía en función del tamaño, el contenido de vitelo, la profundidad y el estado de desarrollo (p.ej.: Samuel *et al.*, 1998; Wehrtmann & Kattner, 1998; Rosa *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008a y b; Figueiredo & Narciso, 2008; Soundarapandian & Singh, 2008; Soundarapandian *et al.*, 2013a).

4.4.5.2. Composición por grupos de ácidos grasos

En este estudio, el grupo de ácidos grasos en mayor abundancia en los huevos iniciales de centolla fueron los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), entre un 39.2% y un 46.1% del total de ácidos grasos, seguidos por los monoinsaturados (MUFA, 27.3%-30.3%), los saturados (SFA, 25.3%-29.9%) y los ramificados (BFA, 0.84%-1.43%). Esta distribución coincide con la observada por Figueiredo & Narciso (2008), donde los poliinsaturados representaron de media más del 40% de los ácidos grasos que componen los huevos de *Maja brachydactyla*.

Se han observado diversos patrones de predominancia de uno u otro grupo de ácidos grasos en los huevos de otras especies de crustáceos decápodos. Así, hay especies donde los PUFA representan más del 45% del total de ácidos grasos (Morais *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008; Leal *et al.*, 2013; Balamurugan *et al.*, 2015), otras donde la predominancia es de los MUFA (Heras *et al.*, 2000; Morais *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2003, 2005, 2007; Jun-jie *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008a y b), otras donde los SFA llegan a predominar hasta valores de casi el 70% (Nates & Mckenney, 2000; Torres *et al.*, 2008; Emerenciano *et al.*, 2012; Soundarapandian *et al.*, 2013a y b; Hamid *et al.*, 2015) e incluso especies donde las proporciones de los tres grupos son similares (Rosa *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012). Estas variaciones en la predominancia de uno u otro grupo de ácidos grasos en el embrión pueden estar influenciadas por el hábitat y la composición de la dieta de las hembras progenitoras, ya que en otros crustáceos decápodos se ha visto una relación directa entre el tipo de alimentación y la abundancia de ácidos grasos específicos en los tejidos de la hembra (Cahu *et al.*, 1994, 1995; Xu *et al.*, 1994b; Sui *et al.*, 2011).

El mayor contenido en ácidos grasos de las puestas posteriores podría estar relacionado con la mayor disponibilidad y diversidad de alimentos para esta especie en primavera-verano. Por grupos, los saturados fueron más abundantes en las primeras puestas del ciclo, mientras que los grupos de monoinsaturados y poliinsaturados fueron mayores en las puestas posteriores. Estas tendencias se observaron en ambas rías, si bien los valores totales de poliinsaturados fueron más elevados en la de A Coruña. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la variabilidad estacional vista por Bernárdez *et al.* (2000) en la dieta de esta especie en la ría de Arousa, observándose un mayor contenido de macroalgas del género Laminariaceae y de bivalvos, especialmente *Mytillus sp.*, en invierno (primeras puestas) y una mayor proporción de holoturias, principalmente la especie *Aslia lefevrei* en verano (posteriores puestas).

A continuación se detallan las tendencias para los ácidos grasos más importantes dentro de cada uno de estos grupos.

4.4.5.3. Composición de los principales ácidos grasos

4.4.5.3.1. Ácidos grasos saturados

Entre los ácidos grasos saturados, encontramos el 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0 como los más importantes (aquellos que aparecen en un porcentaje superior al 1%). Los dos más abundantes, el 16:0 y el 18:0,

aparecen también como predominantes en esta especie en otras latitudes (Figueiredo & Narciso, 2008), aunque en proporciones ligeramente inferiores. En otras especies de crustáceos decápodos como *Lepidophthalmus louisianensis*, estos dos SFA llegan a suponer más del 50% del total de ácidos grasos (Nates & Mckenney, 2000). Es destacable la ausencia en este estudio del 17:0, que en Figueiredo & Narciso (2008) aparecía como ácido graso importante. Este ácido graso, junto con el 15:0, es sintetizado por bacterias heterotróficas marinas, que son abundantes en el sedimento (Rajendran *et al.*, 1993; Volkman *et al.*, 1998). Su ausencia en estas zonas puede deberse, entre otras cosas, a una diferente composición de la dieta con respecto a las de Portugal o a una menor disponibilidad de este ácido en los hábitats de la centolla en las rías gallegas.

4.4.5.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados

En cuanto a los monoinsaturados, los predominantes son 16:1w7, 18:1w7, 18:1w9 y 20:1w9, al igual que sucede en Portugal (Figueiredo & Narciso, 2008). El principal monoinsaturado encontrado, 18:1w9, es un marcador general de una dieta carnívora (Auel *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002; Dalsgaard *et al.*, 2003). Su mayor contenido con respecto al estudio de Figueiredo & Narciso (2008), así como los mayores valores del ratio 18:1w7/18:1w9, indican que su dieta incluye una proporción de presas animales relativamente mayor que la vista en Portugal. Esto coincide con el estudio de Bernárdez *et al.* (2000) sobre composición de la dieta de la centolla en la ría de Arousa, en la que se observó una proporción elevada de invertebrados bentónicos, fundamentalmente equinodermos (holoturias, erizos) y moluscos (bivalvos, gasterópodos). Las variaciones geográficas en la dieta de *Maja brachydactyla* ya han sido previamente observadas por Kergariou (1974) y están relacionadas con su carácter omnívoro y su amplio rango de distribución geográfica.

4.4.5.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados

Los poliinsaturados más prevalentes son 18:2w6, 18:3w3, 20:4w6, 20:5w3, 22:6w3; dentro de ellos, destacan por su elevada proporción el 20:5w3 (eicosapentaenoico, EPA) y el 22:6w3 (docosahexaenoico, DHA), que son ácidos grasos altamente insaturados. Aunque todos ellos aparecieron también en importantes proporciones en el estudio de Figueiredo & Narciso (2008) para la misma especie en Portugal, dicho estudio observó también elevadas proporciones de otros dos ácidos grasos poliinsaturados (20:4w3 y 22:5w3) que en las rías gallegas han aparecido en proporciones notablemente menores.

Los crustáceos decápodos no presentan unos requerimientos absolutos de contenido lipídico en su dieta pero sí presentan necesidades específicas de ácidos grasos poliinsaturados debido a su limitada capacidad de sintetizarlos de novo (Shieh, 1969; Kanazawa *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 1994b; Cavalli *et al.*, 1999; Wouters *et al.*, 1999; Suprayudia *et al.*, 2004). Los ácidos grasos poliinsaturados, componentes esenciales de los organismos marinos, tienen un papel fundamental en la formación y mantenimiento de las membranas celulares, muy por encima de su papel energético (Kattner *et al.*, 2003). Además, al tener un punto de fusión inferior a los saturados, mantienen la fluidez de la membrana en condiciones de baja temperatura (Munro & Thomas, 2004). Por su parte, los ácidos grasos saturados no son esenciales, ya que en general pueden ser sintetizados de novo u obtenerse a partir de la desaturación de los MUFA y PUFA (Rosa *et al.*, 2007).

Dentro de los PUFA podemos distinguir dos grupos, los de serie w3 y los de serie w6. Los de serie w3 son esenciales para el desarrollo y las funciones neuronales (Beltz *et al.*, 2007; Brett *et al.*, 2009), la mejora de las tasas de supervivencia larvaria y las tasas de eclosión (Balamurugan *et al.*, 2015), la resistencia al estrés (Wickins *et al.*, 1995; Koopman & Siders, 2013), la mejora la calidad de los juveniles y el rendimiento en la maduración (Middleditch *et al.*, 1980; Xu *et al.*, 1994b). Por su parte, los de la serie w6

juegan un papel importante en el ciclo reproductivo de las hembras (Bhavan *et al.*, 2010), constatándose para algunos crustáceos decápodos un incremento de la fecundidad con altos valores de w6, especialmente con el linoleico (18:2w6) (Cavalli *et al.*, 1999). El ratio w3/w6 encontrado en huevos de centolla (6.68-9.57) fue superior a los observados en otras especies de crustáceos decápodos, entre 1.5 y 5.64 (Morais *et al.*, 2002; Djunaidah *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2003, 2005; Alava *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008).

Se han identificado en crustáceos decápodos cinco poliinsaturados de particular importancia: el linolénico (18:3w3), el linoleico (18:2w6), el araquidónico (ARA, 20:4w6), el eicosapentaenoico (EPA, 20:5w3) y el docosahexaenoico (DHA, 22:6w3), implicados en el crecimiento, la supervivencia de larvas y juveniles, la maduración ovárica en los reproductores y la producción de huevos de mejor calidad (D'Abramo, 1997; Querijero *et al.*, 1997; Glencross & Smith, 2001; Huang *et al.*, 2008; Parakarma *et al.*, 2009; Balamurugan *et al.*, 2015). A su vez, los dos primeros son precursores, entre otros, del ARA, el EPA y el DHA (Rosa *et al.*, 2007), a través de una ruta metabólica compleja (Naessens *et al.*, 1997; Coman *et al.*, 2007). Su síntesis de novo es limitada (Bottino *et al.*, 1980; Merican & Shim, 1996; Unnikrishnan *et al.*, 2010) o inexistente (Mourente, 1996), por lo que la hembra debe incorporarlos a partir de la dieta durante la gametogénesis (Rosa *et al.*, 2007). Se ha propuesto que la pérdida de la habilidad para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga puede ser debida a su abundancia en la dieta de los carnívoros e incluso omnívoros marinos (Tacon, 1990).

Dentro de éstos, los más altamente insaturados (ARA, EPA y DHA) son los más requeridos como nutrientes esenciales para los organismos marinos (Sargent *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1994b; Lim *et al.*, 1997; Narciso & Moraes, 2001). Estos tres ácidos grasos tienen un papel esencial en el desarrollo embrionario y larvario de muchos crustáceos decápodos, ya que son importantes en el proceso de eclosión (Xu *et al.*, 1994a; Cahu *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2012), como componentes estructurales de las membranas celulares y precursores de la biosíntesis de las prostaglandinas, que intervienen en la reproducción y la vitelogénesis (Tamaru *et al.*, 1997; Tamaru & Ako, 2000; Bell & Sargent, 2003; Tahara & Yano, 2004), en el transporte de agua y la osmorregulación (Li *et al.*, 2012), en el desarrollo del sistema nervioso central de los embriones (Xu *et al.*, 1994a; Cahu *et al.*, 1995; Wen *et al.*, 2002), y en la calidad (Wu *et al.*, 2007a), supervivencia y resistencia a condiciones de estrés en larvas (Figueiredo *et al.*, 2012). Debido a su importancia, el DHA puede llegar a suponer entre un 10-20% del total de ácidos grasos en huevos de crustáceos decápodos (Kattner *et al.*, 1994; Wehrmann & Kattner, 1998; Djunaidah *et al.*, 2003; Jun-jie *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2007). Los valores encontrados en este estudio para huevos de *M. brachydactyla* (15%-17.1%) se encuentran dentro de este rango.

La relación entre EPA y DHA suele emplearse como indicador de nivel trófico de una especie; los valores obtenidos en este estudio (1.14-1.37) indicarían un nivel trófico medio (Auel *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002). La presencia de estos ácidos grasos también es indicadora de producción primaria (Dalsgaard *et al.*, 2003). Las proporciones encontradas en este estudio (23%-28%), similares a las vistas en Portugal, reflejarían una dieta rica en macroalgas (Rosa *et al.*, 2007) tal y como han demostrado los estudios de alimentación en juveniles y adultos de esta especie (Kergariou, 1974, 1984; Bernárdez *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2009).

4.4.5.3.4. Patrones generales de los principales ácidos grasos

En cuanto a las variaciones estacionales de los principales ácidos grasos, se ha observado que cada uno presenta un patrón temporal consistente: la mayor parte de los ácidos grasos aparecen en mayores proporciones en las puestas posteriores, aunque en algunos grupos (SFA y MUFA) se encuentra algún ácido graso con un patrón inverso (16:0, 16:1w7). Destaca el hecho de que, por lo general, el patrón de cada ácido se mantiene en ambas zonas de estudio, tanto para el contenido por huevo como para el

contenido en tejido. El único ácido graso que presentó patrones distintos en ambas rías fue el ácido esteárico (18:0), que fue mayor en las primeras puestas en Arousa y en las posteriores en A Coruña.

En general, el mayor contenido de ácidos grasos esenciales en las puestas posteriores podría indicar una mayor calidad en términos de composición lipídica, tal y como ya se apuntó en el apartado de clases de lípidos. Esta mayor calidad podría traducirse en ventajas para las larvas provenientes de estos huevos. Diversas experiencias con dietas enriquecidas en cultivo de crustáceos decápodos han corroborado los efectos positivos sobre las larvas de una mayor disponibilidad de estos ácidos grasos. El aporte de estos ácidos en la dieta está positivamente correlacionado con sus niveles en huevos (Sui *et al.*, 2011). Se ha comprobado que un mayor aporte en la dieta de la hembra resulta en una mayor tasa de eclosión de los huevos y en una mayor calidad, tasa de supervivencia y de crecimiento de larvas recién eclosionadas (Urcera *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994a; Wickins *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 2000; Cavalli *et al.*, 2001; Palacios *et al.* 2001; Wen *et al.*, 2002; Andrés *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2011).

En futuros estudios sería interesante realizar experiencias de cultivo con puestas de “invierno” y puestas de “primavera-verano” abarcando todo el desarrollo embrionario y larvario para comprobar si las larvas de mejor calidad energética son las de invierno y las de mejor calidad de nutrientes esenciales son las de primavera-verano, además de las implicaciones de estos dos tipos de “calidad” a lo largo del desarrollo larvario hasta el asentamiento del primer juvenil. Esto permitiría constatar la existencia de un efecto “carry-over” a las fases posteriores del ciclo de vida de esta especie.

4.4.6. Composición de ácidos nucleicos

En general, los niveles de ácidos nucleicos por huevo se han mantenido constantes a lo largo del ciclo de cría. Esto se explica porque los niveles de ADN son generalmente constantes para una célula. En este estudio se han tomado huevos en un estado similar de desarrollo y, por lo tanto, es de esperar que presenten un número similar de células. Por su parte, el ARN se relaciona con la síntesis de proteínas durante el crecimiento, de modo que en algunas especies se observa una gran variabilidad en su contenido (Khan & Jafri, 1991; Tripathi & Verma, 2003). La ausencia de diferencias significativas en el contenido de ARN por huevo entre zonas parece indicar que no hay grandes diferencias en la tasa de crecimiento, si bien se han observado pequeñas diferencias solamente en la ría de Arousa que podrían indicar cierto grado de variabilidad.

Sin embargo, comparando el contenido en ácidos nucleicos por mg de tejido, se han encontrado diferencias tanto en el contenido de ADN como el de ARN, aunque solamente en la ría de Arousa. Esto puede estar relacionado con el diferente tamaño de los huevos entre ambas estaciones, de modo que en un mg de tejido de las puestas posteriores habrá mayor número de huevos y, por consiguiente, de células embrionarias.

El ratio ARN/ADN suele usarse en organismos marinos como indicador de crecimiento y de la condición de los individuos (Holland & Hannant, 1973; Buckley, 1984; Buckley *et al.*, 1999; Chicharro & Chicharro, 1995; Dahlhoff, 2004; Caldarone, 2005; Rosa & Nunes, 2005). En general, los individuos en buen estado fisiológico tienden a tener mayores ratios de ARN/ADN (Clemmesen, 1994). Los valores encontrados en este estudio no sugieren diferencias entre sucesivas puestas en cuanto a tasas de crecimiento o actividad de síntesis proteica.

5

**CAMBIOS BIOQUÍMICOS DURANTE EL
DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA CENTOLLA,
M. BRACHYDACTYLA (DECAPODA:MAJIDAE)
EN CONDICIONES EXPERIMENTALES**

5.1. INTRODUCCIÓN

La embriogénesis en crustáceos es un proceso complejo en el cual la diferenciación y proliferación celular ocurren simultáneamente, aunque a diferentes velocidades dependiendo de la temperatura (Gould, 1977) y tanto la organogénesis como el crecimiento somático están controlados por la actividad enzimática (Manush *et al.*, 2006).

Como en otros crustáceos decápodos, *M. brachydactyla* presenta un desarrollo embrionario lecitotrófico, por lo que el desarrollo del embrión depende exclusivamente de las reservas endógenas que contenga el vitelo (Rosa & Nunes, 2002; Pochelon, 2011). Estas reservas endógenas proporcionan los nutrientes necesarios para satisfacer la demanda de energía y mantener los procesos fisiológicos durante el desarrollo y el crecimiento del embrión (Lee, 1991; Whyte *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2006). Asimismo, la calidad y cantidad de estos nutrientes puede tener un impacto sobre la calidad y supervivencia de las larvas (Rosa *et al.*, 2007). Los patrones de utilización de estos nutrientes cambian gradualmente en concordancia con las necesidades específicas de las células, lo cual viene impuesto por el programa genético del embrión (Sargent *et al.*, 1989; Wehrtmann & Kattner, 1998; Rosa *et al.*, 2007). Por otra parte, el grado de utilización de los nutrientes durante el desarrollo embrionario puede determinar los requerimientos nutricionales de las larvas (Rosa *et al.*, 2007). Los requerimientos pueden variar cualitativa y cuantitativamente entre poblaciones de una misma especie o entre especies diferentes (Sargent *et al.*, 1989). También los cambios en las condiciones ambientales pueden afectar al desarrollo del embrión y a la calidad de las larvas que eclosionen (Giménez & Anger, 2003; Giménez *et al.*, 2004; Bas *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2009). Por ello, en última instancia, estos cambios podrían afectar al éxito ontogenético y a la dinámica de las poblaciones a través del tamaño de la descendencia o la viabilidad (Giménez & Torres, 2002; Giménez *et al.*, 2004).

En crustáceos decápodos se han realizado numerosos estudios sobre la composición bioquímica de los huevos durante la embriogénesis (p.ej.: Amsler & George, 1984; Petersen & Anger, 1997; Morais *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2003, 2005, 2007; Calado *et al.*, 2005; García-Guerrero, 2009; Soundarapadian *et al.*, 2013a y b). Su estudio es crucial para el entendimiento del esfuerzo reproductivo y su impacto sobre la dinámica de las poblaciones. Además, es el método más apropiado para evaluar la condición nutricional de los huevos, que viene determinada por el estado nutricional y fisiológico de la hembra progenitora (García-Guerrero *et al.*, 2003b; Racotta & Ibarra, 2003) y sus requerimientos nutricionales durante la embriogénesis (Holland, 1978).

En la centolla, *M. brachydactyla* (Decapoda, Majidae), se han llevado a cabo numerosos estudios sobre diferentes aspectos de su biología desde el punto de vista del crecimiento (p.ej.: González-Gurriarán *et al.*, 1995; Freire *et al.* 2002; Sampedro & González-Gurriarán, 2004; Corgos & Freire, 2006; Corgos *et al.*, 2007; Guerao & Rotllant, 2009), la reproducción (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1996, 1998; Rotllant *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2010), las migraciones (Hines *et al.*, 1995; González-Gurriarán *et al.*, 2002; Bernárdez *et al.*, 2003; Corgos *et al.*, 2006), la dieta (Kergariou, 1974; Brosnan, 1981; Bernárdez *et al.*, 2000) o el desarrollo larvario (Andrés *et al.* 2007, 2008, 2010a y b; Guerao *et al.*, 2008, 2010; Rotllant *et al.*, 2013a). Sin embargo, sobre la primera fase de su ciclo de vida, la embriogénesis, se han realizado pocos estudios, centrados principalmente en el periodo de incubación, con pocas referencias a sus cambios morfológicos (Lang, 1973) o biométricos a lo largo del desarrollo (González-Gurriarán *et al.*, 1993; Iglesias *et al.*, 2002) y con un único estudio sobre los cambios en su composición bioquímica (Figueiredo & Narciso, 2008).

Los lípidos juegan un papel crucial en el metabolismo embrionario, ya que son la principal fuente de energía durante la ontogenia en crustáceos, además de componentes estructurales de las membranas celulares (Amsler & George, 1984; Wehrtmann & Graeve, 1998; Heras *et al.*, 2000). Por su parte, las proteínas sirven como componentes estructurales del tejido y, bajo ciertas condiciones, también pueden tener un papel como fuente de energía (Lemos & Phan, 2001; García-Guerrero *et al.*, 2003a y b). Los carbohidratos, aunque no son la principal fuente de energía (Holland, 1978; García-Guerrero *et al.*, 2003a y b), son esenciales para la síntesis de componentes específicos como la quitina durante el desarrollo de los crustáceos (Holland, 1978; García-Guerrero *et al.*, 2003a y b). La medida de estos componentes durante el desarrollo lecitotrófico determina el rango de utilización de cada componente medido (Lemos & Phan, 2001; García-Guerrero *et al.*, 2003a; Niu *et al.*, 2003). También es de gran importancia la disponibilidad de energía, para cuya estima a partir de la composición bioquímica existen diferentes métodos (Winberg, 1971; Salonen *et al.*, 1973).

Por otro lado, en el desarrollo embrionario es de suma importancia la disponibilidad de ácidos grasos esenciales y su variabilidad, tanto cualitativa como cuantitativa durante el desarrollo (Rosa *et al.*, 2007) para entender mejor los requerimientos esenciales del embrión. Los ácidos grasos esenciales no pueden ser sintetizados de novo (Kanazawa *et al.*, 1979a y b; Mourente, 1996), por lo que su presencia en el embrión depende de su transferencia exitosa por parte de la hembra a las reservas del vitelo en los huevos. Las hembras pueden transferir hasta un 60% de sus reservas de lípidos a sus embriones (Herring, 1973), lo que sugiere un mínimo catabolismo lipídico independiente del suministro del huevo (Rosa & Nunes, 2002). Esto es crucial para el éxito del proceso reproductivo y juega un papel importante en la eclosión y supervivencia de las larvas recién eclosionadas (Cahu *et al.*, 1995; Anger, 1998; Harrison, 1990). Asimismo, la dinámica de los ácidos grasos durante la embriogénesis permite evaluar cuáles son los ácidos grasos que contribuyen más como fuente de energía y como parte de las estructuras de las membranas celulares. El consumo diferencial de ácidos grasos también puede darnos una idea de cuáles son necesarios en la dieta de la larva para lograr un desarrollo exitoso (Rainuzzo *et al.*, 1997).

En los estudios del desarrollo embrionario es fundamental poder clasificar el patrón de desarrollo meroblástico y los cambios morfológicos progresivos que se producen durante el desarrollo del embrión. En crustáceos decápodos se han empleado diferentes criterios cualitativos, como la coloración de los embriones (Moriyasu & Lanteigne, 1998) o los cambios en la forma de estructuras concretas (Dupré, 1988, 2003; Tavonatti, 1998; Tavonatti & Dupré, 2001), y cuantitativos, como el índice ocular (Perkins, 1972), el índice cuantitativo de clasificación de estados (the quantitative staging index; Beltz *et al.*, 1992), la clasificación de estados según porcentaje de desarrollo (the percentage staging; Sandeman & Sandeman, 1991), y el plan diario de clasificación (daily staging schemes; Nazari *et al.*, 2000, 2003).

Este estudio tiene como objetivo caracterizar los cambios en la composición bioquímica (composición elemental, composición bioquímica básica, composición de ácidos grasos y ácidos nucleicos) de los huevos de *M. brachydactyla* en relación a los cambios morfológicos que se producen durante la embriogénesis. Por lo que, se ha desarrollado una nueva clasificación embrionaria que se adapta a la descripción de las variaciones que se producen a nivel bioquímico y su relación con los cambios morfológicos que tienen lugar durante la embriogénesis. Esto puede informar sobre el origen de los requerimientos nutricionales del embrión en cada momento de su desarrollo (García-Guerrero, 2009, 2010). También se estudia la existencia de variaciones en la inversión de la hembra (a nivel de componentes bioquímicos) entre puestas sucesivas bajo condiciones ambientales controladas. El estudio de los requerimientos nutricionales del huevo a lo largo del desarrollo y la inversión de la hembra entre sucesivas puestas puede ayudar a comprender su importancia para la viabilidad y supervivencia de las larvas recién eclosionadas y por consecuencia, para las subsiguientes fases de vida de esta especie.

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Muestreo

Se capturaron individuos adultos de *M. brachydactyla* con embarcaciones de pesca comercial en la ría de A Coruña (NW, Galicia, España) durante el mes de noviembre de 2002, poco antes del comienzo del ciclo de cría (la información sobre la zona de pesca puede ser consultada en el apartado de “Área de Estudio” dentro de “Metodología general”, página 15).

En total se recolectaron 15 individuos (9 hembras no ovígeras y 6 machos), que fueron trasladados a las instalaciones del Centre Mediterrani d'Investigacions Marines i Ambientals (CMIMA) (Barcelona, España) en neveras portátiles con bloques de frío y paños humedecidos en agua de mar, para mantener un nivel de temperatura ($8 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad durante su traslado.

5.2.2. Experiencia de cultivo

Una vez en el laboratorio, se caracterizaron los ejemplares mediante la medida de la longitud del caparazón y el peso fresco individual (ver detalles en el apartado de “Preparación de las Muestras” dentro de la “Metodología General”, página 21). A continuación, fueron introducidos en dos tanques de 2000 l para su aclimatación. En cada tanque se dispusieron 3 machos y 4-5 hembras. Los tanques fueron conectados a unidades de circuito cerrado de agua de mar que mantenían la salinidad constante ($35 \pm 1\text{‰}$) y el fotoperiodo natural. La temperatura osciló entre dos rangos: desde el comienzo de la experiencia hasta finales de abril, en un rango entre 12.1°C y 15°C ($13.9 \pm 0.55^\circ\text{C}$) y desde mayo hasta septiembre, con un rango entre 13.5°C y 16.9°C ($15.3 \pm 0.92^\circ\text{C}$). Estas condiciones experimentales de temperatura imitan a las condiciones ambientales del medio natural de la época invernal, donde las hembras llevan a cabo su primera puesta, y de la época de primavera-verano, donde las hembras llevan a cabo sus posteriores puestas (segunda y tercera puesta normalmente). Los individuos fueron alimentados *ad libitum* con ejemplares congelados de mejillón, *Mytilus* sp. La experiencia de cultivo tuvo una duración de 10 meses, a lo largo de los cuales las hembras llegaron a realizar cuatro puestas consecutivas, una en la temperatura de invierno y tres en la temperatura de primavera-verano. De la cuarta puesta solo se recogieron muestras de los huevos recién desovados.

En el momento en que realizaron el desove, las hembras ovígeras fueron muestreadas cada 4 días, recogiendo muestras de aproximadamente 2 gr de huevos de los pleópodos de cada hembra usando unas pinzas finas.

Sobre dichas muestras se realizaron observaciones macroscópicas de los huevos y, en función de su estado de desarrollo, se asignaron tres estados correspondientes a los descritos por González-Gurriarán *et al.* (1993): estado I, estado II y estado III. También se anotó la coloración o el patrón cromático (de acuerdo con el sistema de correspondencia del color Pantone® Color Matching System (Pantone Inc., Carlstadt, NJ 07072-3098, U.S.A.) de cada muestra de huevos.

A continuación, las muestras se dividieron en dos submuestras. Una submuestra se fijó con formol al 4% durante 48 horas y luego se conservó en alcohol 70º para la posterior caracterización biométrica y morfológica de los huevos; la otra fue lavada con amonio formiato (31.5 g/l) durante 3 minutos para eliminar las sales, congelada a -80°C , y posteriormente liofilizada.

5.2.3. Análisis morfológicos y biométricos de los huevos

Para la descripción cualitativa y cuantitativa del desarrollo embrionario se dispusieron aproximadamente 30 huevos de cada submuestra conservada en alcohol en una placa de metacrilato dividida en cuatro cuadrantes para facilitar la observación de las muestras. Estas placas se examinaron con un estereomicroscopio Nikon SMZ 1500, equipado con un sistema de fotografía DXM-Nikon 1200C, usando luz refleja de una fuente de fibra óptica. Durante estas observaciones se describieron los principales rasgos morfológicos (apéndices, lóbulos oculares, cromatóforos, etc.) y se tomaron una serie de fotografías en el plano sagital de cada muestra de huevos. A continuación, las fotografías fueron analizadas con un software de análisis de imagen NIS de Nikon. Este sistema de análisis de imagen fue calibrado empleando fotografías digitales de un micrómetro ajustado a la altura del plano medio de un embrión, usándose el valor medio ($\text{pixels} \cdot \text{mm}^{-1}$) de tres imágenes digitalizadas.

Se llevaron a cabo una serie de medidas biométricas relacionadas con el tamaño del huevo: anchura (diámetro mayor o antero-posterior, AH), longitud (diámetro menor o dorso-ventral, LH) y el diámetro medio; y con la mancha ocular: área, anchura (diámetro mayor o del eje antero-posterior, AO) y longitud (diámetro menor o del eje dorso-ventral, LO). Una vez se realizaron las mediciones, las fotografías fueron revisadas para obtener descripciones complementarias de las características morfológicas de los embriones fijados de cada muestra de huevos.

A continuación, se estimó el volumen medio de los huevos (V), mediante la fórmula de un elipsoide: $V = \pi \cdot \text{AH}^2 \cdot \text{LH} / 6$ (Turner & Lawrence, 1979; Odinetz-Collart & Rabelo, 1996); y el índice ocular (IO), mediante la fórmula $\text{IO} = (\text{AO} + \text{LO}) / 2$ (Perkins, 1972).

Para comprobar que la periodicidad en la recogida de muestras durante las experiencias de cultivo (cuatro días) era la adecuada para la caracterización del desarrollo embrionario, se realizó un seguimiento detallado en 3 hembras, tomando muestras diarias de 40 huevos. Cada muestra se dividió en dos: una parte se observó in vivo para mejorar la descripción de los rasgos morfológicos y la otra parte se sumergió en Bouin durante cinco minutos para facilitar la observación de algunas estructuras internas del embrión (Moriyasu & Lanteigne, 1998).

También se estimó el porcentaje de desarrollo de los huevos en cada día de recogida de muestra, tomando como 0% el día de desove de los huevos y como 100% el día de eclosión de los huevos (tiempo de incubación) (Sandeman & Sandeman, 1991).

5.2.4. Análisis bioquímicos

Sobre las muestras liofilizadas se realizaron una serie de análisis del contenido en: agua, cenizas, materia orgánica, carbono y nitrógeno (mediante un análisis elemental), lípidos (método de Bligh & Dyer, 1959), ácidos grasos (Lepage & Roy, 1984), carbohidratos (método de Dubois *et al.*, 1956), ácidos nucleicos (método de Clemmesen, 1993 y Mokness *et al.*, 2000) y energía (energía^s, Salonen *et al.*, 1976 y energía^w, Winberg, 1971). A partir del nitrógeno se estimó el contenido proteico mediante un factor de conversión del nitrógeno (Gnaiger & Bitterlich, 1984). Todos los análisis bioquímicos se realizaron por triplicado, exceptuando los de composición elemental (carbono y nitrógeno) y los de composición de ácidos grasos. En este caso, solo se hicieron réplicas en caso de discrepancias significativas entre muestras. Las técnicas analíticas se detallan en el apartado “Técnicas Analíticas” dentro de “Metodología General” (página 27).

5.2.5. Análisis estadísticos

En primer lugar, dado que en este estudio se presentan medidas repetidas (en cada hembra se llevan a cabo mediciones de las variables de estudio a lo largo de su desarrollo embrionario), se evaluó la correlación que existe entre las medidas de cada hembra, ya que si la correlación es alta, no se pueden considerar como independientes dichas medidas y tendría que incluirse la variable hembra como factor aleatorio. El análisis de esta correlación interclase (ICC) se llevó a cabo mediante modelos lineales mixtos (LMM, Generalized Linear Mixed Models, Pinheiro & Bates (2000)). Todas las variables estudiadas muestran un $ICC \approx 0$, teniendo en cuenta que el rango del ICC va de 0 (ausencia de correlación) a 1 (correlación total), se asumió que hubo independencia entre las medidas llevadas a cabo en cada hembra, por lo que no fue necesario incluir la variable hembra como factor aleatorio.

El efecto del porcentaje de desarrollo sobre las variables biométricas, diámetro medio e índice ocular, de las tres puestas consecutivas se testó mediante modelos de regresión en los que se incluyó una covariable continua y un factor (análisis de la covarianza) (ANCOVA), empleando el porcentaje de desarrollo como covariable y la puesta como factor.

La variabilidad a lo largo del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas de la composición biométrica y bioquímica de los huevos, se testó mediante una ANOVA de dos vías con interacción entre los factores. La variable respuesta fue cada una de las variables de estudio (diámetro medio, volumen, índice ocular, agua, materia orgánica, cenizas, carbono, relación C/N, lípidos, proteínas, carbohidratos, energía^s, energía^w, ácidos grasos, ADN, ARN y relación ARN/ADN) y los factores fueron el estado de desarrollo embrionario (con seis niveles: estado I, estado II, estado III, estado IV, estado V y estado VI de desarrollo embrionario) y la puesta (con tres niveles: primera puesta, segunda puesta o tercera puesta) ($Y = \text{Puesta} + \text{Estado de desarrollo} + \text{Puesta} : \text{Estado de desarrollo}$). A continuación, los casos donde las diferencias fueron significativas se evaluaron mediante el test *a posteriori* de Tukey-Kramer. Para la composición de ácidos grasos solamente se realizaron análisis de su contenido en las dos primeras puestas, por lo que en este caso en el análisis de ANOVA de dos vías el factor número de puesta tiene solo dos niveles (primera y segunda puesta).

La variabilidad entre puestas consecutivas de un estado concreto de desarrollo del huevo (estado I) se evaluó con una ANOVA de una vía, cuya variable respuesta fue cada una de las variables de estudio (diámetro medio, volumen, índice ocular, agua, materia orgánica, cenizas, carbono, relación C/N, lípidos, proteínas, carbohidratos, energía^s, energía^w, ADN, ARN y relación ARN/ADN) y el factor fue la puesta en el estado I de desarrollo embrionario (con cuatro niveles: primera puesta, segunda puesta, tercera puesta o cuarta puesta). A continuación, los casos donde las diferencias fueron significativas se evaluaron mediante el test *a posteriori* de Tukey-Kramer. En este análisis se incluyeron los datos de una cuarta puesta, última puesta consecutiva realizada por las hembras en esta experiencia de cultivo y de la que solo se tienen los datos de los huevos en estado I. En esta parte del estudio no se analizó la composición de ácidos grasos porque no se pudieron hacer los análisis en la cuarta puesta.

Todos los datos de las variables de estudio fueron presentados como promedio y su desviación estándar o típica (media \pm desviación estándar) a lo largo de la descripción de los resultados de este capítulo.

5.3. RESULTADOS

Para este estudio de cultivo se utilizaron hembras que presentaban un tamaño similar con una talla media de 152.85 ± 3.74 mm (Fig.5.1), por lo que no presentaron una relación significativa con la mayoría de las variables de este estudio (Anexo, Tabla 1.2). Los pocos casos donde se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$), presentaban una correlación baja (r^2 menor de 0.2), como la relación de la talla con el volumen en el estado II y III de desarrollo embrionario, debido a la alta variabilidad de los datos de volumen entre tallas.

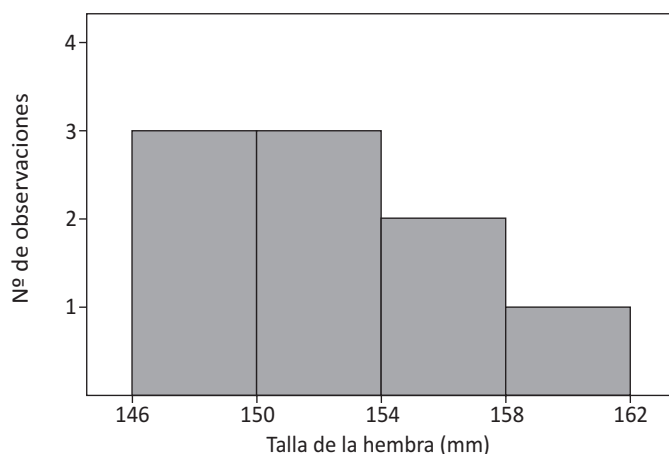


Fig. 5.1. Histograma de frecuencias de tallas de las hembras usadas en este estudio.

5.3.1. Determinación de estados de desarrollo embrionario

Para poder llevar a cabo un estudio adecuado del desarrollo embrionario desde un punto de vista bioquímico, se hizo necesario realizar una nueva clasificación embrionaria basada en criterios cuantitativos (volumen y diámetro del huevo, índice ocular, porcentaje de desarrollo) y cualitativos (coloración, presencia de ojos y de diversas estructuras, movimientos del embrión) que fueran fáciles de percibir con la simple observación de los huevos bajo una lupa binocular y que permitiera subdividir el estado I (que comprende la mitad del desarrollo embrionario, según clasificación de González-Gurriarán *et al.*, 1993) en diferentes estados para poder analizar de forma detallada las fases iniciales de diferenciación y proliferación celular que tienen lugar en el huevo en desarrollo.

En este estudio el desarrollo embrionario de *M. brachydactyla* se clasificó en seis estados de desarrollo embrionario en base a las descripciones realizadas y a la comparación con el estudio detallado realizado por Lang (1973), donde se diferenciaban nueve estados de desarrollo en función de los cambios que se producen dentro del huevo, tanto a nivel morfológico como histológico.

A continuación se presenta una descripción detallada de cada uno de los estados embrionarios junto con una cronología de la totalidad del desarrollo (Tabla 5.1) donde se muestran de forma resumida los cambios morfológicos que tienen lugar durante la embriogénesis de los huevos de *M. brachydactyla*. Asimismo, se muestran una serie de medidas biométricas realizadas a los embriones (Tabla 5.2) junto con la comparación de clasificaciones anteriores realizadas para los huevos de centolla.

Estado 1

Tras la fertilización y la extrusión de los huevos a la cavidad abdominal comienza el primer estado de desarrollo embrionario. Los huevos de *M. brachydactyla* recién fecundados son esféricos o levemente ovalados y están formados por una cubierta con dos capas adheridas entre sí, el endocorion embrionario de color naranja claro (Pantone®1514C) (Fig.5.9) y el exocorion transparente de origen materno (Fig. 5.2a, Tabla 5.1). Durante este estado se produce la división celular y se aprecia como la superficie del huevo está dividida en numerosos blastómeros pequeños y poligonales, en el centro de los cuales se observa un núcleo (Fig. 5.2b y c). Comienza la gastrulación, produciéndose una elevada concentración de células de color blanquecino en la superficie del huevo, que dan lugar al disco germinal (Fig. 5.3a). En la zona central del disco germinal se aprecia una pequeña depresión triangular, el blastoporo (Fig. 5.3b). Al final de la fase se produce la diferenciación del primordio del embrión, como una masa de células blanquecina en forma de V, en la que todavía no se aprecia ninguna estructura diferenciada (Fig. 5.3c). La duración de este estado va del 0 al 25.7% del desarrollo embrionario (Fig. 5.10).

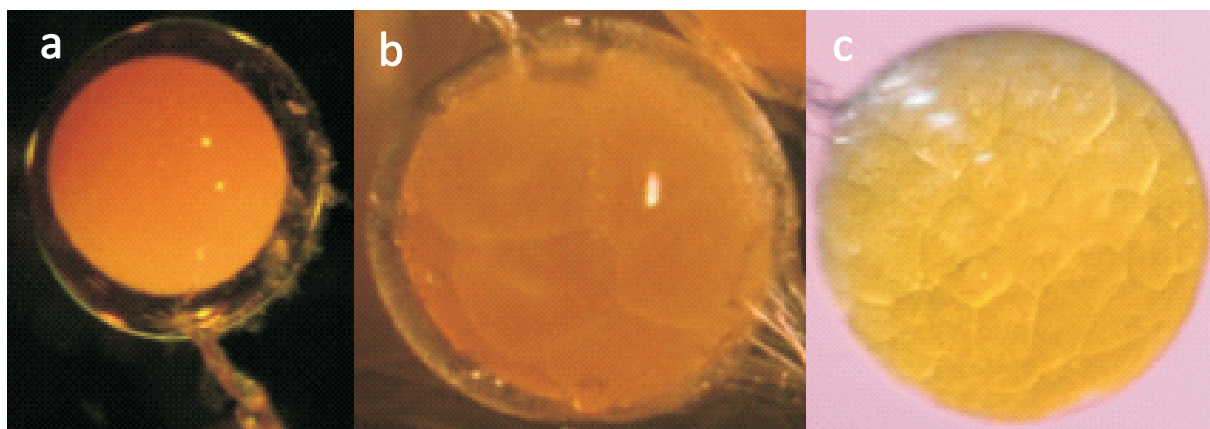


Fig.5.2. División celular durante el primer estado de desarrollo embrionario, (a) huevo sin división, (b) y (c) división celular en diferentes momentos.

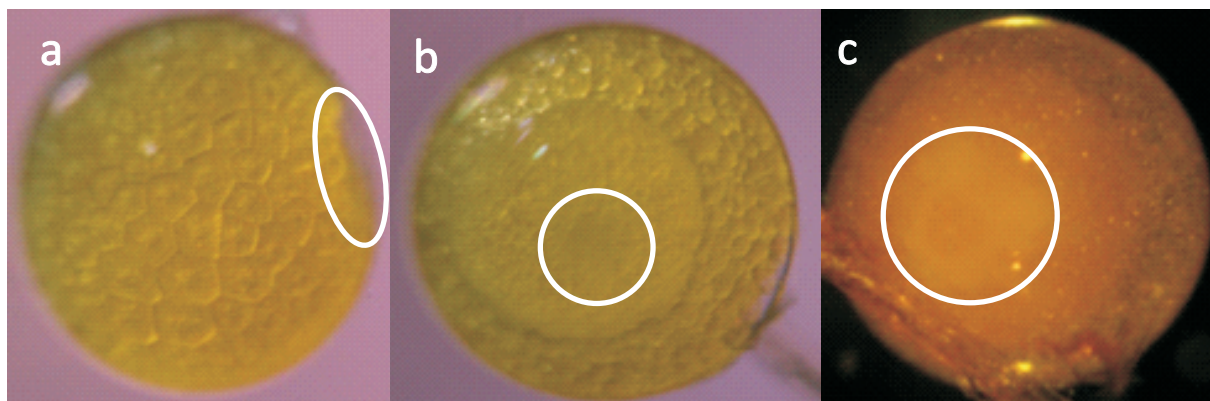


Fig.5.3. Gastrulación (a), blastoporo (b) y primordio del embrión en forma de V (c).

Estado 2

Este estado se caracteriza por la aparición del nauplio y el cambio de coloración de los huevos hacia un naranja oscuro (Pantone® 152C) (Fig. 5.9, Tabla 5.1). En el disco germinal se diferencia primero la papila caudal y a continuación, en una posición anterior a esta, aparecen los esbozos de los tres pares de apéndices naupliares (antenas I y antenas II y mandíbulas) (Fig. 5.4). Al final de este estado se diferencian los lóbulos ópticos en el extremo superior del nauplio sobre las antenas I (Fig. 5.4c). El embrión aumenta de tamaño observándose como la papila caudal comienza a crecer y curvarse. La duración de este estado va del 25.7 al 36% del desarrollo embrionario (Fig. 5.10).

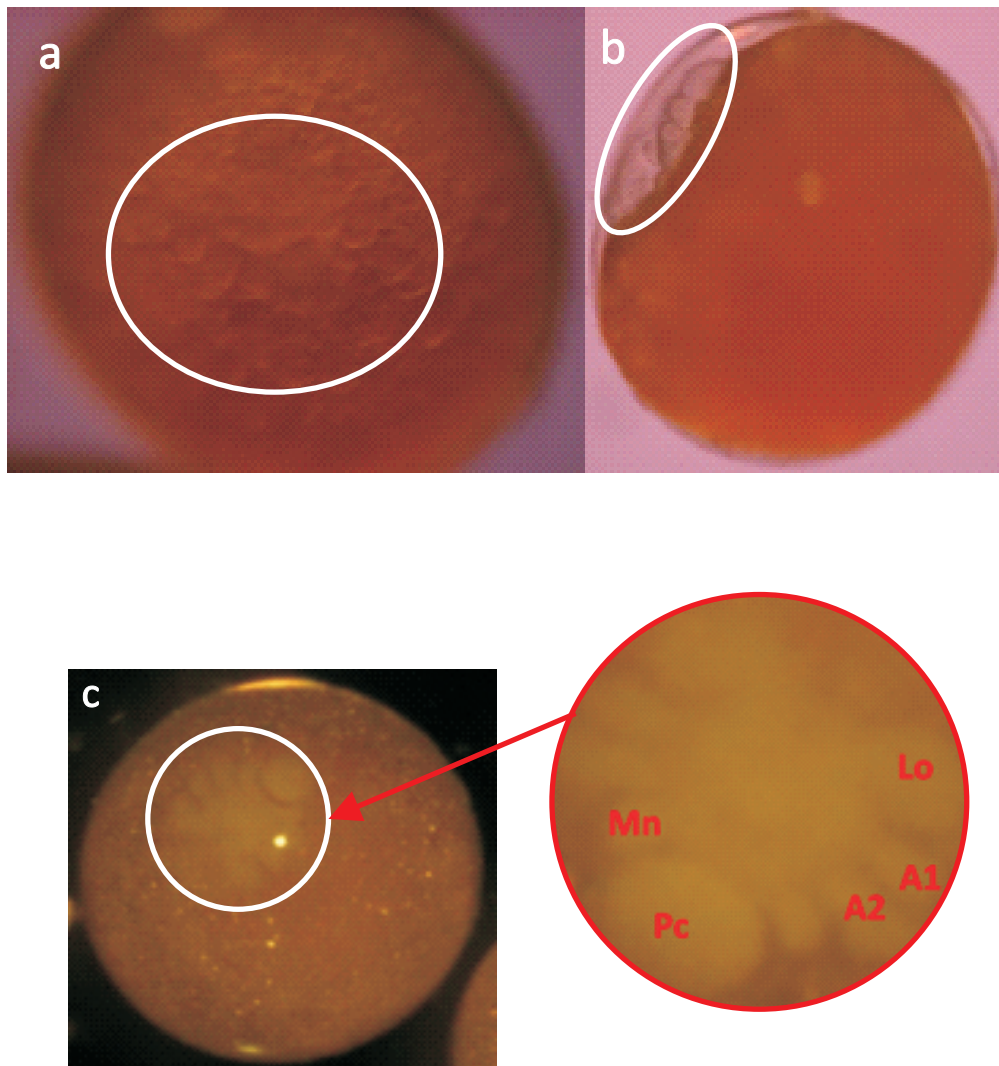


Fig.5.4. Detalle del nauplio en dos posiciones frontal (a) y lateral (b) y (c) detalle de los esbozos de los tres pares de apéndices naupliares: las antenas I (A1) y II (A2) y mandíbulas (Mn), lóbulos ópticos (Lo) y la papila caudal (Pc).

Estado 3

Este estado se caracteriza por la aparición del metanauplio y la coloración continua siendo naranja oscuro (Pantone® 152C) (Fig. 5.9, Tabla 5.1). Se observa aumento del tamaño del embrión, principalmente en el eje longitudinal, adquiriendo la característica forma de C. Los lóbulos ópticos y las antenas (I y II) comienzan a curvarse lateralmente desde la parte anterior hacia la posterior del embrión y las antenas II aparecen bilobuladas en su parte distal (Fig. 5.5). A lo largo de este estado, la papila caudal, que presenta una forma bilobulada en su extremo, se va diferenciando en la placa torácica y abdominal (Fig. 5.5c). Al final del estado comienza una segmentación superficial del abdomen y se observan lateralmente, los esbozos de los maxilípedos. La duración de este estado va del 36 al 56.3% del desarrollo embrionario (Fig. 5.10).

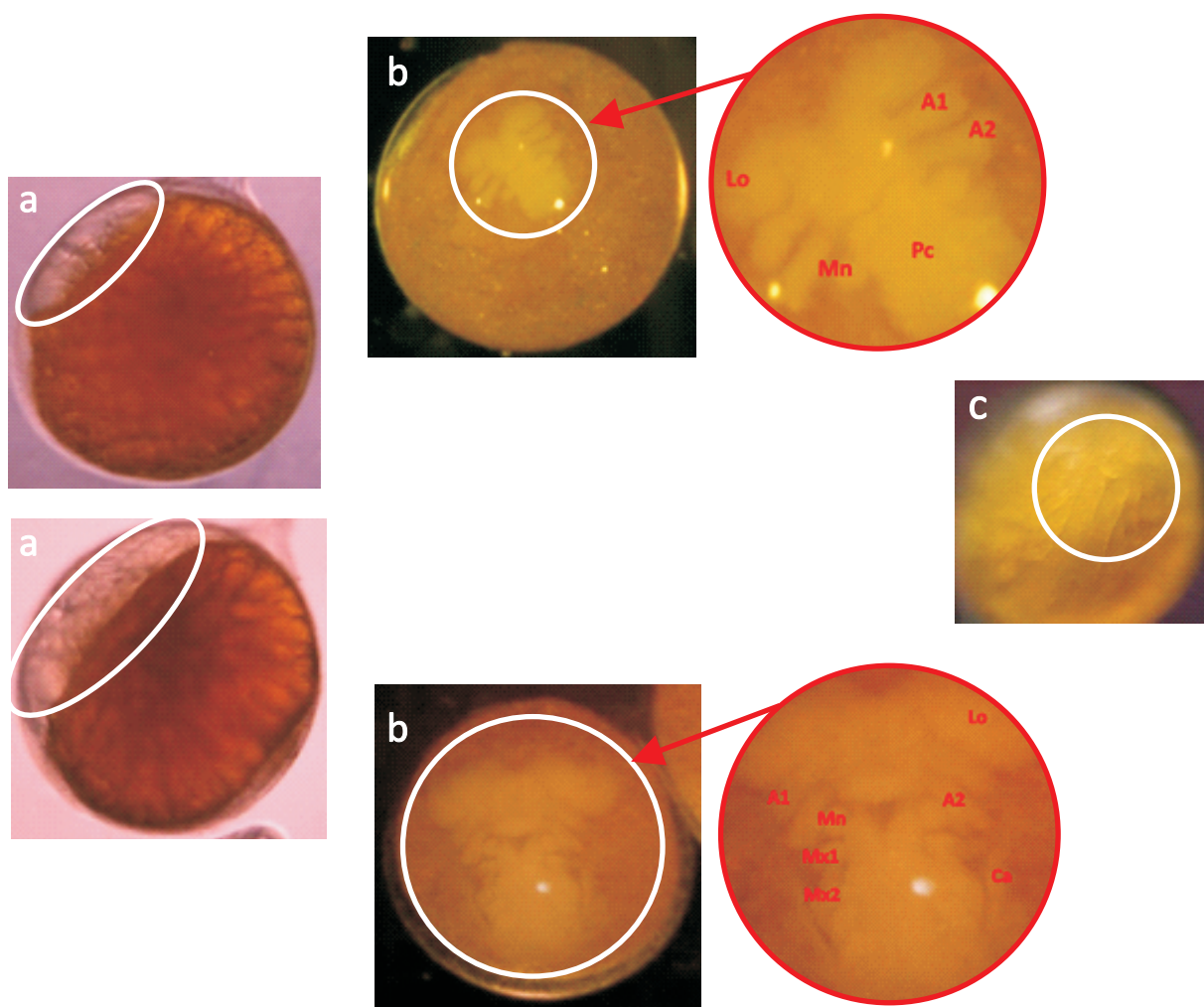


Fig.5.5. Detalle del metanauplio en un fase temprana (arriba) y en una fase tardía dentro del estadio (abajo). Se presentan los embriones en dos posiciones: lateral (a) y frontal (b), con el detalle de los tres pares de apéndices: las antenas I (A1) y II (A2) y mandíbulas (Mn), lóbulos ópticos (Lo), la papila caudal (Pc), esbozos de los maxilípedos I (Mx1) y II (Mx2) y detalle de la papila caudal (c) bilobulada en el extremo.

Estado 4

En este estado comienza el proceso de formación de una delgada área pigmentada localizada en la región distal del lóbulo óptico: la mancha ocular. La coloración permanece en naranja oscuro (Pantone® 152C) (Fig. 5.9, Tabla 5.1). Las antenas y las maxilas continúan creciendo en longitud (Fig. 5.6). Aparecen los primeros cromatóforos, como pequeños puntos en la base de los apéndices y según avanza este estado, en zonas más distales. Se distinguen dos tipos de cromatóforos en función de su pigmentación: rojos y negros (Figs. 5.6a y b). El telson se diferencia del abdomen, adquiriendo forma de horquilla, y aparecen las primeras sedas en su parte distal (Fig. 5.6c). La duración de esta fase va del 56.3 al 67.6% del desarrollo embrionario (Fig. 5.10).

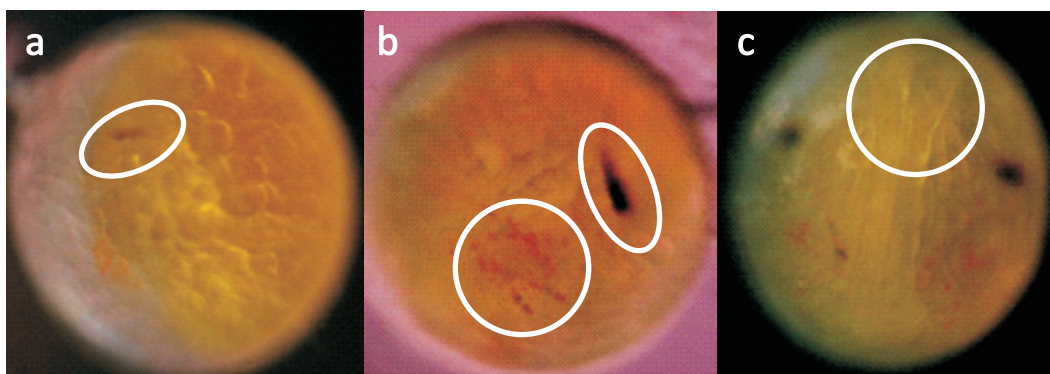


Fig.5.6. Mancha ocular en forma de media luna y aparición de dos tipos de cromatóforos (a y b). Diferenciación del telson (c).

Estado 5

En este estado se aprecia como la mancha ocular en forma de media luna se transforma en un ojo de forma oval. Los huevos cambian de coloración del naranja oscuro al marrón (Pantone® 1685C) (Fig. 5.9, Tabla 5.1). Los cromatóforos (rojos y negros), en mayor número y tamaño, se encuentran distribuidos por todo el embrión (Fig. 5.7). El abdomen sigue alargándose y alcanzando la base de los lóbulos ópticos (Figs. 5.7a y b). La segmentación del abdomen aparece bien diferenciada y se observan las extremidades bien formadas (Figs. 5.7b y c). Se distingue el corazón como una vesícula transparente en posición dorsal, y comienza a apreciarse su latido de forma intermitente (Fig. 5.7c). Al final de este estado se observan los

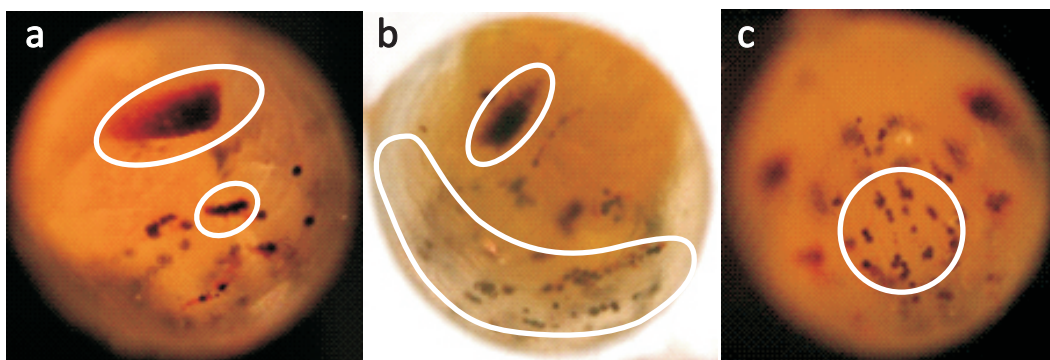


Fig.5.7. Detalle del ojo en forma oval, de los apéndices y de los cromatóforos (a y b) y la segmentación del abdomen bien diferenciada (c.)

Estado 6

El embrión ocupa la mayor parte del espacio disponible dentro del huevo (Fig. 5.8). Se produce un nuevo cambio de coloración del huevo, del marrón al gris oscuro (Pantone® 440C) (Fig. 5.9, Tabla 5.1). El vitelo se encuentra reducido y dividido en dos lóbulos (Fig. 5.8c). En los ojos se distinguen las facetas hexagonales típicas de los omatidios. Los cromatóforos adquieren forma estrellada y se unen formando cordones longitudinales (Fig. 5.8b). El telson sobrepasa la base de los lóbulos ópticos. La parte distal del telson y los apéndices presentan numerosas sedas. El latido del corazón es continuo y regular. Los movimientos de las extremidades son frecuentes y más fuertes. En la eclosión, la larva recién eclosionada está recubierta por una membrana transparente que se rompe con los primeros movimientos de la larva. La duración de este último estado va del 83.1 al 100% del desarrollo

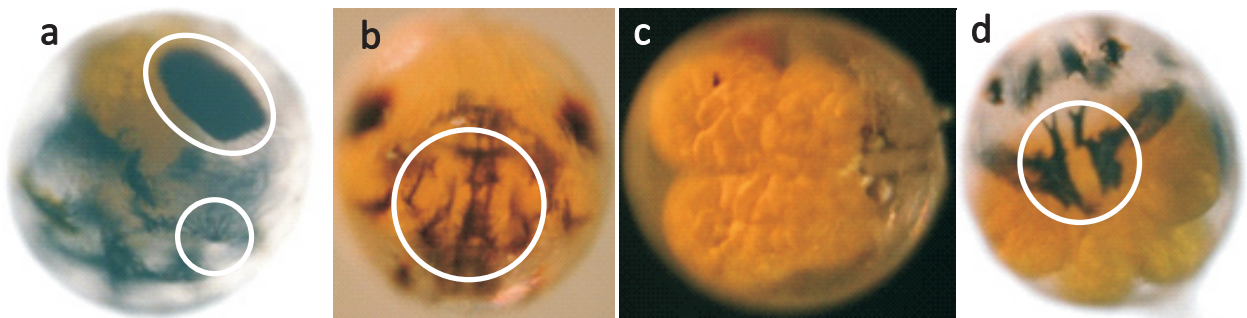


Fig.5.8. Detalle del ojo con los omatidios, cordones de cromatóforos (a y b) y del vitelo reducido dividido en dos lóbulos y la membrana del corazón (c y d).

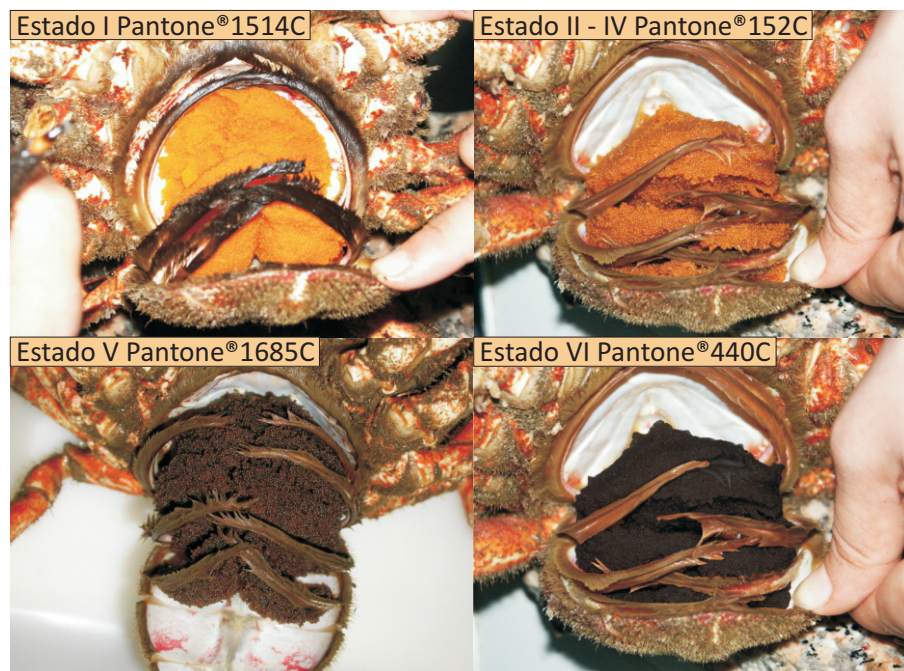


Fig.5.9. Detalle del cambio de coloración de las puestas a lo largo del desarrollo embrionario.

En base a los estados de desarrollo descritos y al porcentaje de desarrollo del embrión en cada estadio se realizó una cronología de los cambios morfológicos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario de los huevos de *M. brachydactyla*, desde el momento del desove hasta la eclosión.

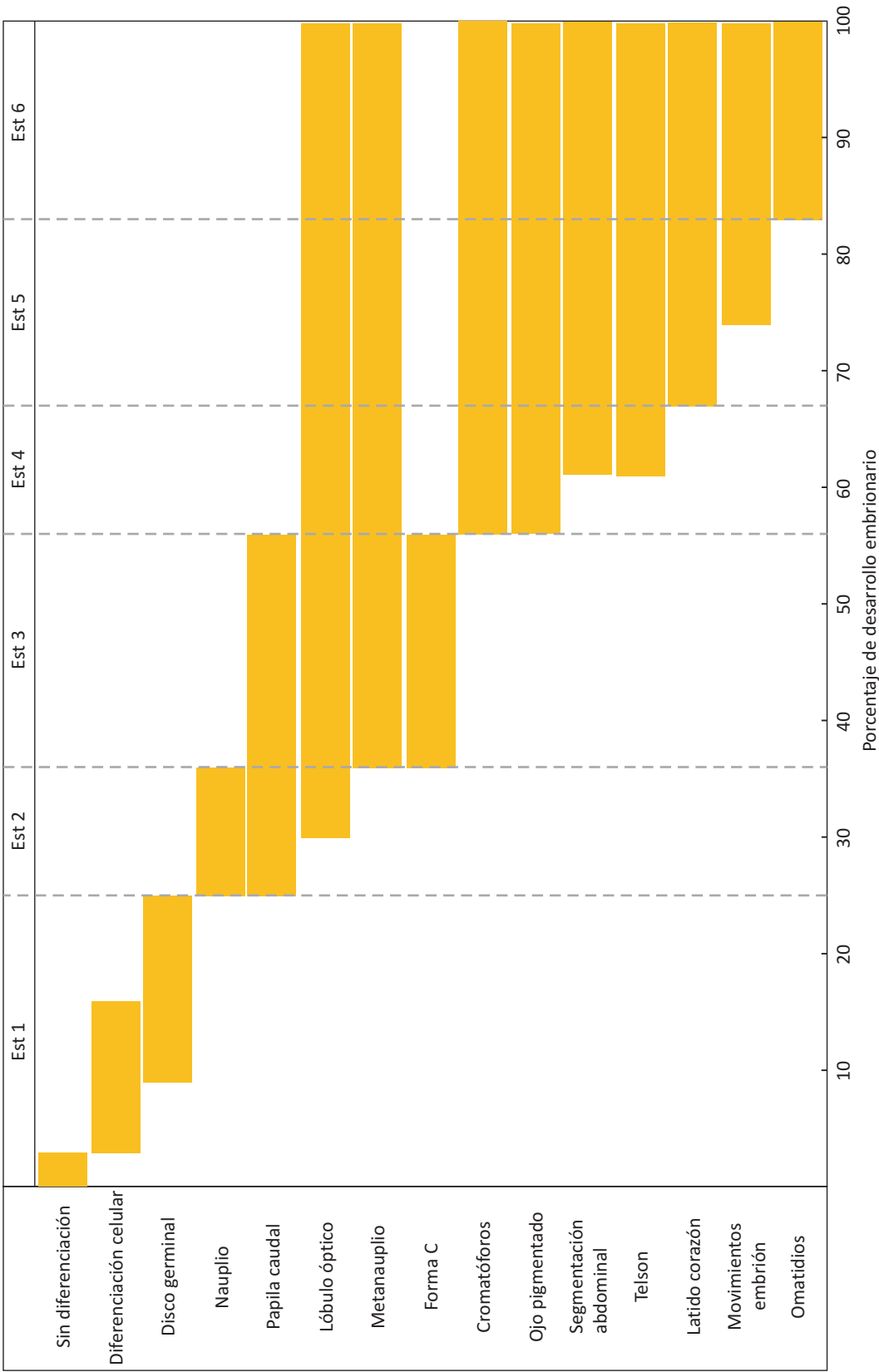


Fig.5.10. Momento de aparición de las estructuras embrionarias y de la visualización de los movimientos del embrión durante el desarrollo embrionario de *M. brachydactyla*.

En la siguiente tabla se muestran las principales características biométricas de los huevos de *M. brachydactyla* a lo largo del desarrollo embrionario en condiciones experimentales.

Tabla 5.1. Características morfométricas de los huevos de *M. brachydactyla* a lo largo del desarrollo embrionario con la clasificación realizada en este estudio y adaptada a las diferentes clasificaciones existentes.

| Estados de desarrollo (presente estudio) | Estados de desarrollo de Lang (1973) | | Estados de desarrollo de González-Guriarán et al., 1993 | | Coloración | % D | | DHE (días) | | DMH (µm) | | AH (µm) | | LH (µm) | | V (mm³*10³) | |
|--|--------------------------------------|-----------|---|------------|-----------------------|--------------|-----------------|------------|-----------------|-------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|-------------|-----------------|
| | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | | X (± SD) | Rango (Min-Max) | X (± SD) | Rango (Min-Max) | X (± SD) | Rango (Min-Max) | X (± SD) | Rango (Min-Max) | X (± SD) | Rango (Min-Max) | X (± SD) | Rango (Min-Max) |
| Estado I | | | | Estado I | Naranja claro (1514C) | 11.96 ± 7.31 | 0-25.70 | 57.1 ± 6.3 | 43 ± 69 | 713.5 ± 9.3 | 693.1 ± 731 | 688.2 ± 11.2 | 661 ± 713.8 | 739.9 ± 11.3 | 719.9 ± 765.1 | 197.3 ± 8.1 | 181.2 ± 215.5 |
| | | | | | | 29.88 ± 3.46 | 25.70-36 | 41.3 ± 5.2 | 27 ± 49 | 734.2 ± 3.9 | 726.7 ± 743.3 | 706.6 ± 8.1 | 689.9 ± 719.9 | 763.8 ± 9.5 | 743.4 ± 783.7 | 215.8 ± 4.7 | 206.9 ± 226.6 |
| | | | | | | 45.06 ± 7.16 | 36-56.38 | 31.4 ± 4.5 | 21 ± 42 | 751.8 ± 4.2 | 740.2 ± 760.5 | 723.5 ± 10.3 | 701.1 ± 738.5 | 783.7 ± 9.8 | 765.9 ± 805.7 | 232.6 ± 5.8 | 221.7 ± 250.1 |
| Estado II | | | | Estado II | Naranja oscuro (152C) | 61.88 ± 3.76 | 56.38-67.6 | 22.2 ± 3.6 | 14 ± 28 | 765.6 ± 4.6 | 748.3 ± 773.5 | 739 ± 9.6 | 721.9 ± 754 | 794.7 ± 9.1 | 777.8 ± 808.6 | 244.3 ± 4.5 | 235.6 ± 254 |
| | | | | | | 76.86 ± 5.81 | 67.60-83.10 | 13.1 ± 3.5 | 6 ± 20 | 781.9 ± 5.9 | 768.9 ± 794.1 | 755.5 ± 9.8 | 740.5 ± 776.4 | 811.7 ± 7.1 | 797.9 ± 827.2 | 260.6 ± 6.3 | 251.6 ± 276.1 |
| Estado V | | | | Estado III | Marrón (1685C) | 93.18 ± 3.13 | 83.10-100 | 3.8 ± 3.3 | 0 ± 7 | 802.5 ± 9.5 | 784.7 ± 816.4 | 777.4 ± 12.3 | 755.1 ± 799.5 | 832.1 ± 10.6 | 812.2 ± 851 | 282 ± 9.5 | 266.3 ± 296.1 |
| Estado VI | | | | Estado IV | Gris (440 C) | | | | | | | | | | | | |

Se representa la comparación con las clasificaciones del desarrollo embrionario de *M. brachydactyla* de otros estudios. El significado de las siglas es %D: porcentaje de desarrollo, DHE: días antes de la eclosión, DMH: diámetro medio del huevo, AH: diámetro mayor o antero-posterior del huevo, LH: diámetro menor o dorso-ventral del huevo, V: Volumen del huevo.

Tabla 5.1. Características morfométricas de los huevos de *M. brachydactyla* a lo largo del desarrollo embrionario con la clasificación realizada en este estudio (continuación).

| Estados de desarrollo (presente estudio) | Estados de desarrollo Lang (1973) | Estados de desarrollo González-Gurriarán et al., 1993 | Estados de desarrollo Iglesias et al., 2002 | ARO (µm²) | | AO (µm) | | LO (µm) | | IO (µm) | |
|--|-----------------------------------|---|---|------------------|-------------------|---------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | | | X (± SD) | Rango (Min-Max) | X (± SD) | Rango (Min-Max) | X (± SD) | Rango (Min-Max) | X (± SD) | Rango (Min-Max) |
| Estado I | Estado I | Estado I | Estado I | | | | | | | | |
| | Estado II | | | | | | | | | | |
| | Estado III | | | | | | | | | | |
| Estado II | Estado IV | Estado I | Estado I | | | | | | | | |
| Estado III | Estado V | | | | | | | | | | |
| | Estado VI | | | | | | | | | | |
| Estado IV | Estado VII | Estado II | Estado II | 3760.5 ± 2897.4 | 860.8 ± 12170 | 100.83 ± 37.5 | 50.46 ± 193.40 | 47.85 ± 17.27 | 25.58 ± 93.77 | 60.42 ± 20.67 | 29.96-115.69 |
| Estado V | Estado VIII | | Estado III | 20652.6 ± 6709.6 | 3722.9 ± 36580.7 | 227.8 ± 32.4 | 109.87 ± 290.53 | 120.39 ± 25.66 | 47.07 ± 166.07 | 165.39 ± 28.99 | 95.78-203.65 |
| Estado VI | Estado IX | | Estado IV | 40453 ± 5276.9 | 26888.6 ± 49263.2 | 277.99 ± 17.6 | 247.36 ± 309.63 | 191.19 ± 17.18 | 144.13 ± 213.37 | 228.07 ± 16.41 | 185.88-249.31 |

Se representa la comparación con las clasificaciones del desarrollo embrionario de *M. brachydactyla* de otros estudios. El significado de las siglas es ARO: área del ojo, AO: diámetro mayor o antero-posterior del ojo, LH: diámetro menor o dorso-ventral del ojo, IO: índice ocular.

5.3.2. Características biométricas de los huevos a lo largo del desarrollo embrionario

El tamaño de los huevos de *M. brahydactyla*, medido como diámetro medio (DMH) y como volumen (V), presentó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre los distintos estados a lo largo del desarrollo embrionario. Se observó un aumento entre un 11.3% y un 12.8% del diámetro medio y entre un 40.1% y un 42.6% del volumen durante la embriogénesis (Tablas 5.2 y 5.3). El mayor incremento de tamaño del huevo se produjo entre el estado V y VI de desarrollo, donde se observaron incrementos medios del $2.7 \pm 0.61\%$ para el diámetro medio y del $8.6 \pm 1.07\%$ para el volumen. En cuanto al índice ocular, también presentó diferencias significativas entre estados de desarrollo (ANOVA, $p < 0.001$), sobre todo entre el estado IV (momento de aparición del ojo) y el estado V, pasando de valores medios de $66.33 \pm 17.59 \mu\text{m}$ a valores de $165.15 \pm 26.58 \mu\text{m}$ (Tablas 5.2 y 5.3).

Tabla 5.2. Variaciones en las características biométricas (diámetro medio (DMH), volumen medio (V) e índice ocular (IO)) de los huevos de *M. brahydactyla* a lo largo del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1ª, 2ª y 3ª). Se incluyen los datos de la cuarta puesta en la que solo se tiene el estado I. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar y el porcentaje de incremento desde el estado I al VI (si es significativo) del desarrollo embrionario. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo y puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Estado de desarrollo embrionario | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------|
| | Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado V | Estado VI | % Incremento |
| 1ª Puesta | DMH (μm) | 714.63 \pm 11.51 ^f | 730.81 \pm 3.87 ^e | 749.20 \pm 7.25 ^d | 764.48 \pm 3.97 ^c | 778.91 \pm 4.96 ^b | 802.06 \pm 10.19 ^a | 12.23 |
| | V (mm^3) | 0.198 \pm 0.010 ^f | 0.212 \pm 0.005 ^e | 0.229 \pm 0.007 ^d | 0.243 \pm 0.005 ^c | 0.256 \pm 0.005 ^b | 0.280 \pm 0.010 ^a | 41.41 |
| | IO (μm) | | | | 65.82 \pm 19.35 ^c | 163.28 \pm 27.27 ^b | 231.52 \pm 19.51 ^a | 251.75 |
| 2ª Puesta | DMH (μm) | 712.39 \pm 9.62 ^f | 730.54 \pm 5.58 ^e | 744.62 \pm 8.18 ^d | 763.69 \pm 2.98 ^c | 779.14 \pm 6.07 ^b | 803.41 \pm 8.32 ^a | 12.78 |
| | V (mm^3) | 0.197 \pm 0.008 ^f | 0.212 \pm 0.007 ^e | 0.225 \pm 0.010 ^d | 0.242 \pm 0.003 ^c | 0.257 \pm 0.006 ^b | 0.281 \pm 0.009 ^a | 42.64 |
| | IO (μm) | | | | 59.38 \pm 20.05 ^c | 164.27 \pm 30.83 ^b | 230.32 \pm 14.57 ^a | 287.87 |
| 3ª Puesta | DMH (μm) | 712.47 \pm 7.78 ^f | 731.06 \pm 3.80 ^e | 746.81 \pm 7.71 ^d | 764.56 \pm 2.65 ^c | 777.59 \pm 3.87 ^b | 793.03 \pm 6.65 ^a | 11.31 |
| | V (mm^3) | 0.197 \pm 0.007 ^f | 0.213 \pm 0.005 ^e | 0.229 \pm 0.007 ^d | 0.241 \pm 0.007 ^c | 0.257 \pm 0.007 ^b | 0.276 \pm 0.008 ^a | 40.10 |
| | IO (μm) | | | | 73.81 \pm 13.37 ^c | 167.89 \pm 21.64 ^b | 224.01 \pm 10.19 ^a | 203.50 |
| 4ª Puesta | DMH (μm) | 704.44 \pm 4.90 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | V (mm^3) | 0.190 \pm 0.005 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | IO (μm) | | | | ---- | ---- | ---- | ---- |

Para la totalidad del desarrollo, el tamaño de los huevos (DMH y V) presentó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre puestas, apreciándose en la primera puesta mayores tamaños de huevos que en las otras dos puestas (Tabla 5.3). También se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) en el índice ocular entre puestas sucesivas, observándose los mayores valores ($157.7 \pm 70.08 \mu\text{m}$) para el total del desarrollo en la primera puesta.

Tabla 5.3. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en las características del huevo (diámetro medio (DMH), volumen del huevo (V) e índice ocular (IO) a lo largo del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1ª, 2ª y 3ª) de *M.brachydactyla*. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|----------------------|-------------------|-----|--------|--------|--------|
| V (mm ³) | Puesta | 2 | 8795 | 167.34 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 36819 | 700.52 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 33 | 0.63 | 0.79 |
| | Error | 254 | 53 | | |
| DMH (µm) | Puesta | 2 | 10844 | 197.90 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 42393 | 773.61 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 64 | 1.17 | 0.31 |
| | Error | 254 | 55 | | |
| IO (µm) | Puesta | 2 | 1629 | 3.42 | <0.05 |
| | Estado desarrollo | 2 | 225278 | 472.34 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 4 | 309 | 0.65 | 0.63 |
| | Error | 98 | 477 | | |

El tamaño de los huevos recién desovados (estado I) de cuatro puestas consecutivas no mostró diferencias significativas, ni en el volumen ni en el diámetro medio (Tabla 5.4)

Tabla 5.4. Resultados de las ANOVAS de una vía evaluando las diferencias en las características del huevo en estado I (diámetro medio (DMH) y volumen del huevo (V)) entre puestas consecutivas (1ª, 2ª, 3ª y 4ª) de *M.brachydactyla*. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|----------------------|--------|----|--------|------|------|
| V (mm ³) | Puesta | 3 | 124.79 | 2.03 | 0.12 |
| | Error | 82 | 61.41 | | |
| DMH (µm) | Puesta | 3 | 207.64 | 2.51 | 0.06 |
| | Año | 82 | 82.78 | | |

Se ajustó un modelo de regresión lineal para las relaciones porcentaje de desarrollo con el diámetro medio del huevo y con el índice ocular para cada una de las tres puestas consecutivas de *M. brachydactyla* (Fig. 5.11, Tabla 5.5). El porcentaje de desarrollo presentó una relación positiva significativa tanto con el diámetro medio ($r^2 = 0.96$, $p < 0.001$) como con el índice ocular ($r^2 = 0.94$, $p < 0.001$) de los huevos a lo largo del desarrollo embrionario.

El ANCOVA mostró diferencias significativas entre puestas sucesivas para la relación del porcentaje de desarrollo con el diámetro medio del huevo, apreciándose una interacción significativa entre el porcentaje de desarrollo y la puesta ($p < 0.001$) con valores para las pendientes de 1.06 (1ª puesta), 1.08 (2ª puesta) y 1.02 (3ª puesta). Para valores bajos de porcentaje de desarrollo (0-20%) parece que los valores del diámetro medio del huevo fueron similares entre puestas consecutivas, mientras que para valores más elevados, la primera y la segunda puesta presentaron valores de diámetro medio superiores a la tercera puesta. Entre las dos primeras puestas para un incremento dado del porcentaje de desarrollo, los valores de diámetro medio del huevo fueron similares hasta valores elevados (en torno al 80%), a partir de los cuales la Segunda puesta mostró valores de diámetro medio ligeramente superiores.

En cuanto al índice ocular, se observó una interacción significativa entre la primera y la segunda puesta ($p<0.001$) y entre la segunda y la tercera puesta ($p<0.05$) pero no entre la primera puesta, con pendientes de 5.66, y la tercera puesta, con pendientes de 5.58. Para la mayor parte del desarrollo (hasta aproximadamente el 85%), en la segunda puesta parecen apreciarse valores superiores del índice ocular que en las otras dos puestas, mientras que en los porcentajes de desarrollo más elevados (90-100%) los valores del índice ocular fueron similares en las tres puestas consecutivas.

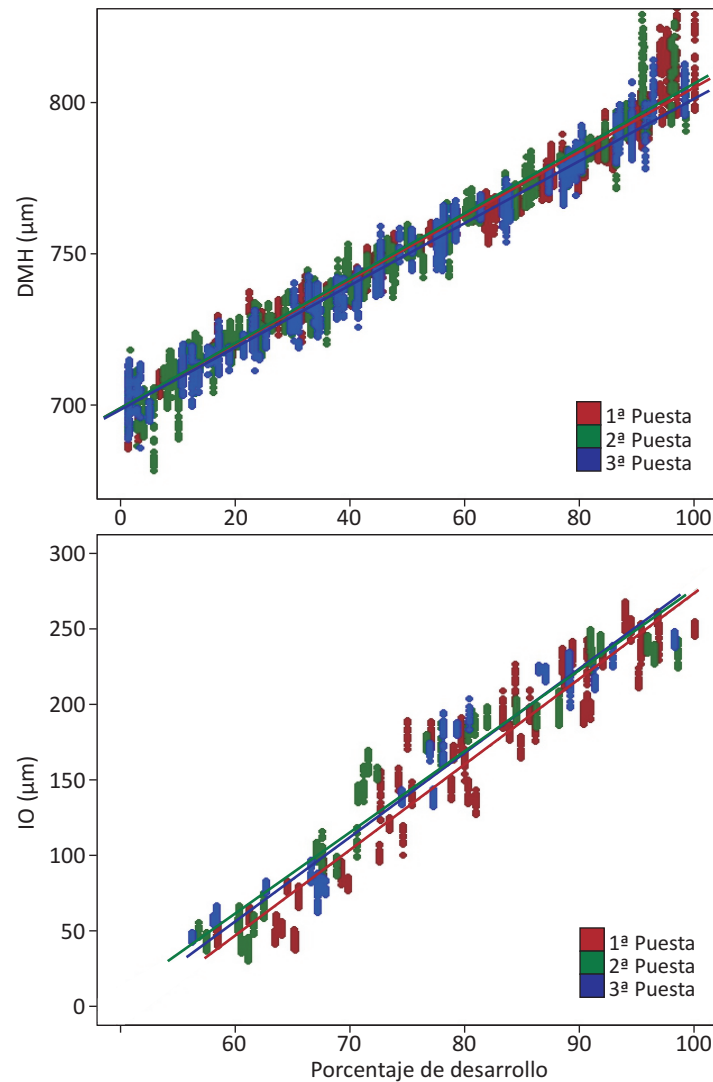


Fig.5.11. Cambios en el diámetro medio del huevo (DMH, izquierda) y el índice ocular (IO, derecha) en función del porcentaje de desarrollo del huevo en tres puestas consecutivas de *M.brachydactyla*.

Tabla 5.5. Resultados de la ANCOVA ($Y=a + b1*Desarrollo + b2*Puesta + b3*Desarrollo:Puesta$) testando el efecto del porcentaje de desarrollo (porcentaje de desarrollo, covariable) y la puesta en el diámetro medio del huevo (μm) y en el índice ocular (μm) de los huevos de tres puestas consecutivas de *M. brachydactyla*. Se indican los parámetros de las ecuaciones de regresión, el nivel de significancia P y el coeficiente de determinación r^2 .

| y | a | b1 | Intersección por Puesta | b2 | Intersección por Desarrollo | b3 | p | r^2 |
|-----|---------|------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|-----------|-------|
| DMH | 698.94 | 1.06 | 1º P vs 2º P | -0.74 ($p<0.05$) | 1º P vs 2º P | 0.02 ($p<0.01$) | $p<0.001$ | 0.96 |
| | | | 1º P vs 3º P | -0.33 ($p=0.43$) | 1º P vs 3º P | -0.04 ($p<0.001$) | | |
| | | | 2º P vs 3º P | 0.4 ($p=0.24$) | 2º P vs 3º P | -0.05 ($p<0.001$) | | |
| IO | -293.32 | 5.66 | 1º P vs 2º P | 32.48 ($p<0.001$) | 1º P vs 2º P | -0.29 ($p<0.001$) | $p<0.001$ | 0.94 |
| | | | 1º P vs 3º P | 14.45 ($p=0.06$) | 1º P vs 3º P | -0.08 ($p=0.41$) | | |
| | | | 2º P vs 3º P | -18.03 ($p<0.05$) | 2º P vs 3º P | 0.21 ($p<0.05$) | | |

5.3.3. Composición básica del huevo a lo largo del desarrollo embrionario

El contenido en agua, materia orgánica y cenizas del tejido ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre estados a lo largo del desarrollo embrionario de *M. brachydactyla* (Fig. 5.12, Tablas 5.6 y 5.7). Así, el contenido en agua se incrementó entre el comienzo y el final del desarrollo ($32 \pm 0.40\%$), apreciándose un mayor incremento en las fases de desarrollo finales, entre estado IV y el estado VI ($19.2 \pm 0.15\%$). Mientras, el contenido en materia orgánica descendió drásticamente entre un 69.5-71% durante la embriogénesis. El mayor descenso de materia orgánica se produjo entre los estados V y VI ($45.4 \pm 0.77\%$). Por su parte, el contenido de cenizas aumento en alta proporción (más del triple) desde valores iniciales entre 26.5 y 28.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PH hasta finales entre 87.6 y 89.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PH. El mayor aumento del contenido de cenizas se produjo entre los estados I y II ($43.0 \pm 2.10\%$).

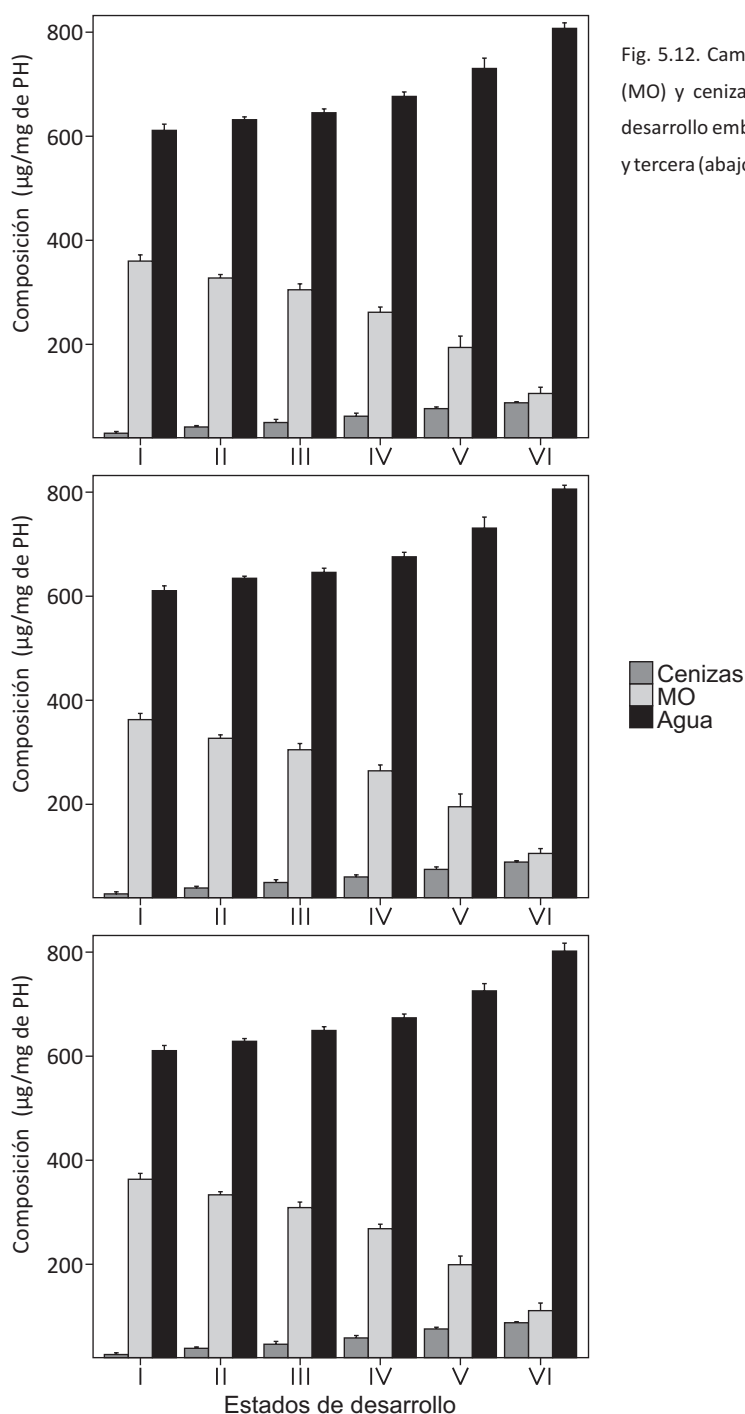


Fig. 5.12. Cambios en el contenido en agua, materia orgánica (MO) y cenizas por mg de tejido ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) a lo largo del desarrollo embrionario de la primera (arriba), segunda (centro) y tercera (abajo) puestas consecutivas de *M. brachydactyla*.

Para la totalidad del desarrollo, se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) en el contenido de las tres variables por mg de tejido entre puestas consecutivas. La primera puesta mostró los valores más elevados de agua ($688.1 \pm 67.78 \mu\text{g/mg PH}$) y cenizas ($59.4 \pm 20.17 \mu\text{g/mg PH}$) y un menor contenido de materia orgánica ($252.4 \pm 87.02 \mu\text{g/mg PH}$) que la segunda y tercera puesta. No se apreciaron diferencias en la interacción entre puesta-estado de desarrollo para ninguna de las tres variables, manteniéndose la misma tendencia para las tres puestas (Tablas 5.6 y 5.7).

La comparación del contenido de agua, materia orgánica y cenizas ($\mu\text{g/mg PH}$) de huevos recién desovados (estado I) de cuatro puestas consecutivas no mostró diferencias significativas entre puestas (Tabla 5.8).

Tabla 5.7. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido de agua, materia orgánica (MO) y cenizas a lo largo del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1ª, 2ª y 3ª) de *M.brachydactyla*. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|---------------------------------|-------------------|-----|--------|---------|--------|
| Agua ($\mu\text{g/mg PH}$) | Puesta | 2 | 33185 | 276.22 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 200830 | 1671.63 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 33 | 0.28 | 0.99 |
| | Error | 254 | 120 | | |
| MO ($\mu\text{g/mg PH}$) | Puesta | 2 | 64300 | 360.41 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 348493 | 1953.35 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 25 | 0.14 | 1.00 |
| | Error | 254 | 178 | | |
| Cenizas ($\mu\text{g/mg PH}$) | Puesta | 2 | 5111 | 288.51 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 21363 | 1205.86 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 13 | 0.73 | 0.69 |
| | Error | 254 | 18 | | |

Tabla 5.8. Resultados de las ANOVAS de una vía evaluando las diferencias en el contenido de agua, materia orgánica (MO) y cenizas de los huevos en estado I entre puestas consecutivas (1ª, 2ª, 3ª y 4ª) de *M.brachydactyla*. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|---------------------------------|--------|----|--------|------|------|
| Agua ($\mu\text{g/mg PH}$) | Puesta | 3 | 30.38 | 0.31 | 0.82 |
| | Error | 82 | 97.97 | | |
| MO ($\mu\text{g/mg PH}$) | Puesta | 3 | 67.45 | 0.47 | 0.71 |
| | Año | 82 | 144.36 | | |
| Cenizas ($\mu\text{g/mg PH}$) | Puesta | 3 | 16.50 | 1.30 | 0.28 |
| | Año | 82 | 12.71 | | |

Tabla 5.6. Variaciones en el contenido en agua, materia orgánica (MO) y cenizas por mg de tejido ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado I al VI (si es significativo) del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1ª, 2ª, 3ª) de *M. brachydactyla*. Se incluyen los datos de la cuarta puesta en la que solo se tiene el estado I. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo y puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Estado de desarrollo embrionario | | | | | | |
|--|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado V | Estado VI |
| Agua ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 611.06 \pm 11.88 ^{fg} | 631.52 \pm 5.28 ^{de} | 645.02 \pm 7.36 ^d | 676.34 \pm 8.82 ^c | 730.27 \pm 19.39 ^b | 807.01 \pm 10.51 ^a |
| MO ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 360.14 \pm 11.97 ^a | 327.61 \pm 6.28 ^{bc} | 305.03 \pm 10.99 ^d | 261.74 \pm 9.87 ^e | 193.53 \pm 22.06 ^f | 105.36 \pm 11.92 ^g |
| Cenizas ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 28.80 \pm 3.25 ^g | 40.87 \pm 2.59 ^{ef} | 49.95 \pm 5.57 ^d | 61.92 \pm 5.42 ^c | 76.19 \pm 3.35 ^b | 87.63 \pm 2.12 ^a |
| Agua (% PH) | 61.11 \pm 1.14 | 63.15 \pm 0.50 | 64.50 \pm 0.72 | 67.63 \pm 0.85 | 73.03 \pm 1.89 | 80.70 \pm 1.02 |
| MO (% PH) | 36.01 \pm 1.15 | 32.76 \pm 0.59 | 30.50 \pm 1.07 | 26.17 \pm 0.95 | 19.35 \pm 2.15 | 10.54 \pm 1.15 |
| Cenizas (% PH) | 2.88 \pm 0.31 | 4.09 \pm 0.24 | 5 \pm 0.54 | 6.19 \pm 0.52 | 7.62 \pm 0.33 | 8.76 \pm 0.20 |
| Agua ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 610.26 \pm 9.63 ^g | 634.38 \pm 4.15 ^{de} | 645.85 \pm 7.76 ^d | 675.53 \pm 8.88 ^c | 730.50 \pm 21.18 ^b | 805.68 \pm 7.56 ^a |
| MO ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 362.33 \pm 12.49 ^a | 326.81 \pm 6.28 ^b | 304.58 \pm 11.98 ^d | 263.99 \pm 11.87 ^e | 194.86 \pm 25.03 ^f | 105.21 \pm 9.31 ^g |
| Cenizas ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 27.41 \pm 4.04 ^g | 38.81 \pm 3.71 ^f | 49.57 \pm 5.70 ^d | 60.48 \pm 3.71 ^c | 74.64 \pm 4.58 ^b | 89.12 \pm 2.29 ^a |
| Agua (% PH) | 61.03 \pm 0.95 | 63.44 \pm 0.40 | 64.58 \pm 0.76 | 67.55 \pm 0.84 | 73.05 \pm 2.04 | 80.57 \pm 0.71 |
| MO (% PH) | 36.23 \pm 1.23 | 32.68 \pm 0.61 | 30.46 \pm 1.17 | 26.40 \pm 1.13 | 19.49 \pm 2.41 | 10.52 \pm 0.87 |
| Cenizas (% PH) | 2.74 \pm 0.40 | 3.88 \pm 0.36 | 4.96 \pm 0.56 | 6.05 \pm 0.35 | 7.46 \pm 0.44 | 8.91 \pm 0.21 |
| Agua ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 610.46 \pm 9.74 ^g | 628.07 \pm 5.59 ^{ef} | 645.22 \pm 7.36 ^d | 673.74 \pm 7.07 ^c | 725.41 \pm 13.89 ^b | 801.89 \pm 15.05 ^a |
| MO ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 362.99 \pm 11.91 ^a | 333.33 \pm 6.30 ^b | 308.67 \pm 10.89 ^{cd} | 268.05 \pm 9.07 ^e | 199.21 \pm 16.71 ^f | 110.54 \pm 15.14 ^g |
| Cenizas ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 26.55 \pm 3.23 ^g | 38.60 \pm 2.52 ^f | 46.11 \pm 5.82 ^{de} | 58.22 \pm 4.42 ^c | 75.38 \pm 3.77 ^b | 87.57 \pm 2.16 ^a |
| Agua (% PH) | 61.05 \pm 0.95 | 62.81 \pm 0.53 | 64.52 \pm 0.71 | 67.37 \pm 0.67 | 72.54 \pm 1.29 | 80.19 \pm 1.41 |
| MO (% PH) | 36.30 \pm 1.17 | 33.33 \pm 0.59 | 30.87 \pm 1.05 | 26.80 \pm 0.86 | 19.92 \pm 1.55 | 11.05 \pm 1.42 |
| Cenizas (% PH) | 2.66 \pm 0.32 | 3.86 \pm 0.24 | 4.61 \pm 0.56 | 5.82 \pm 0.42 | 7.54 \pm 0.35 | 8.76 \pm 0.20 |
| Agua ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 607.23 \pm 7.82 | --- | --- | --- | --- | --- |
| MO ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 366.11 \pm 9.97 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Cenizas ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | 26.65 \pm 2.54 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Agua (% PH) | 60.70 \pm 0.78 | --- | --- | --- | --- | --- |
| MO (% PH) | 36.60 \pm 1.00 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Cenizas (% PH) | 2.66 \pm 0.25 | --- | --- | --- | --- | --- |

5.3.4. Composición bioquímica del huevo a lo largo del desarrollo embrionario

Para el estudio de la composición bioquímica de los huevos de *M. brachydactyla* a lo largo del desarrollo embrionario y entre puestas sucesivas se emplearon dos métodos de estimación: uno indirecto, a partir del análisis elemental de carbono y nitrógeno y otro directo, mediante medidas directas de lípidos y carbohidratos. El contenido de nitrógeno se empleó para estimar mediante un factor de conversión (Gnaiger & Bitterlich, 1984) las proteínas. Asimismo, se hizo un cálculo del contenido de energía utilizando dos métodos de estimación indirecta, un método a partir de carbono, energía^s (Salonen *et al.*, 1976) y otro método a partir de lípidos, proteínas y carbohidratos, energía^w (Winberg, 1971).

La composición bioquímica (carbono, lípidos, proteínas y carbohidratos) presentó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) durante la embriogénesis de *M. brachydactyla* en las tres puestas estudiadas (Figs. 5.13 y 5.14, Tablas 5.9 y 5.10).

El contenido de carbono y de lípidos por mg de tejido descendió desde valores iniciales (estado I) entre $487.3 \pm 6.63 \mu\text{g/mg PS}$ (2ª puesta) y $492.7 \pm 9.43 \mu\text{g/mg PS}$ (1ª puesta) hasta valores finales entre $421.7 \pm 5.42 \mu\text{g/mg PS}$ (1ª puesta) y $423.9 \pm 6.08 \mu\text{g/mg PS}$ (3ª puesta) para el carbono y valores iniciales (estado I) entre $235.7 \pm 4.11 \mu\text{g/mg PS}$ (2ª puesta) y $237.7 \pm 4.65 \mu\text{g/mg PS}$ (1ª puesta) hasta valores finales entre $134.7 \pm 19.75 \mu\text{g/mg PS}$ (1ª puesta) y $149.7 \pm 8.29 \mu\text{g/mg PS}$ (3ª puesta) para los lípidos. El contenido de estas dos variables fue descendiendo ligeramente hasta la mitad del desarrollo (estado III) y luego de forma más acusada hasta el final del desarrollo, con un descenso medio mayor ($11.6 \pm 0.17\%$ para el carbono y $33.3 \pm 4.78\%$ para los lípidos) entre los estados IV y VI del desarrollo. Asimismo, para el contenido de carbohidratos por mg de tejido se apreció una tendencia general de descenso, apreciándose una reducción de su contenido inicial entre un 7.1% (3ª puesta) y un 9.5% (2ª puesta) al final del desarrollo embrionario.

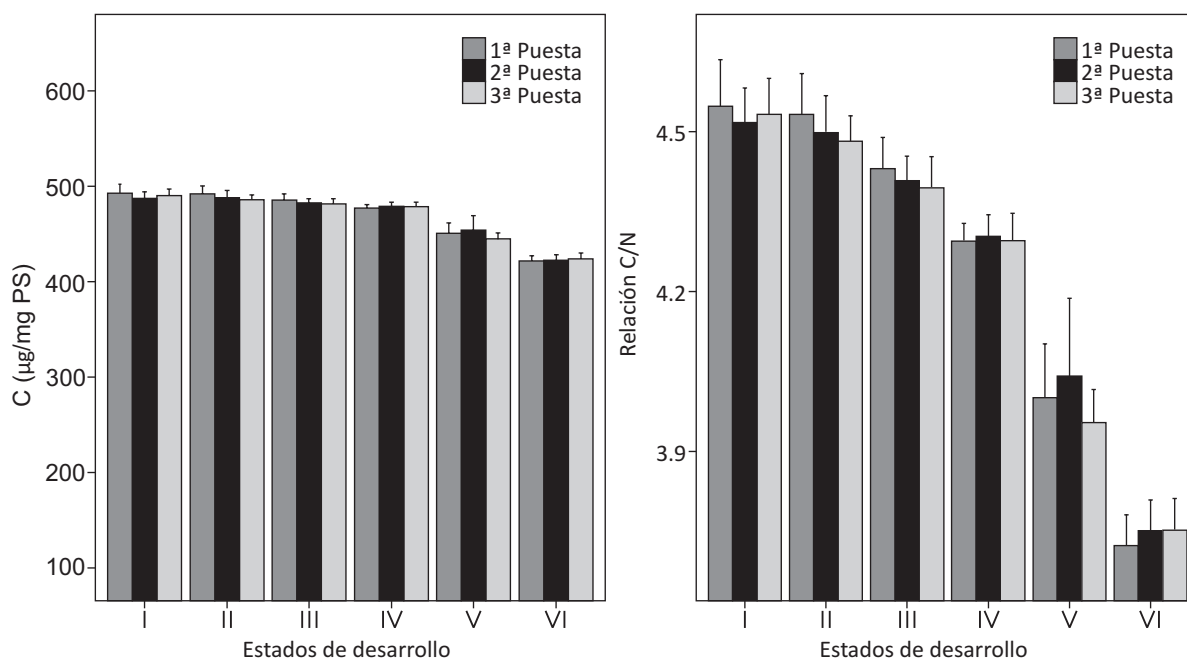


Fig.5.13. Cambios en el contenido de carbono (izquierda) y de la relación C/N (derecha) por mg de tejido ($\mu\text{g/mg PS}$) a lo largo del desarrollo embrionario en tres puestas consecutivas de *M. brachydactyla*.

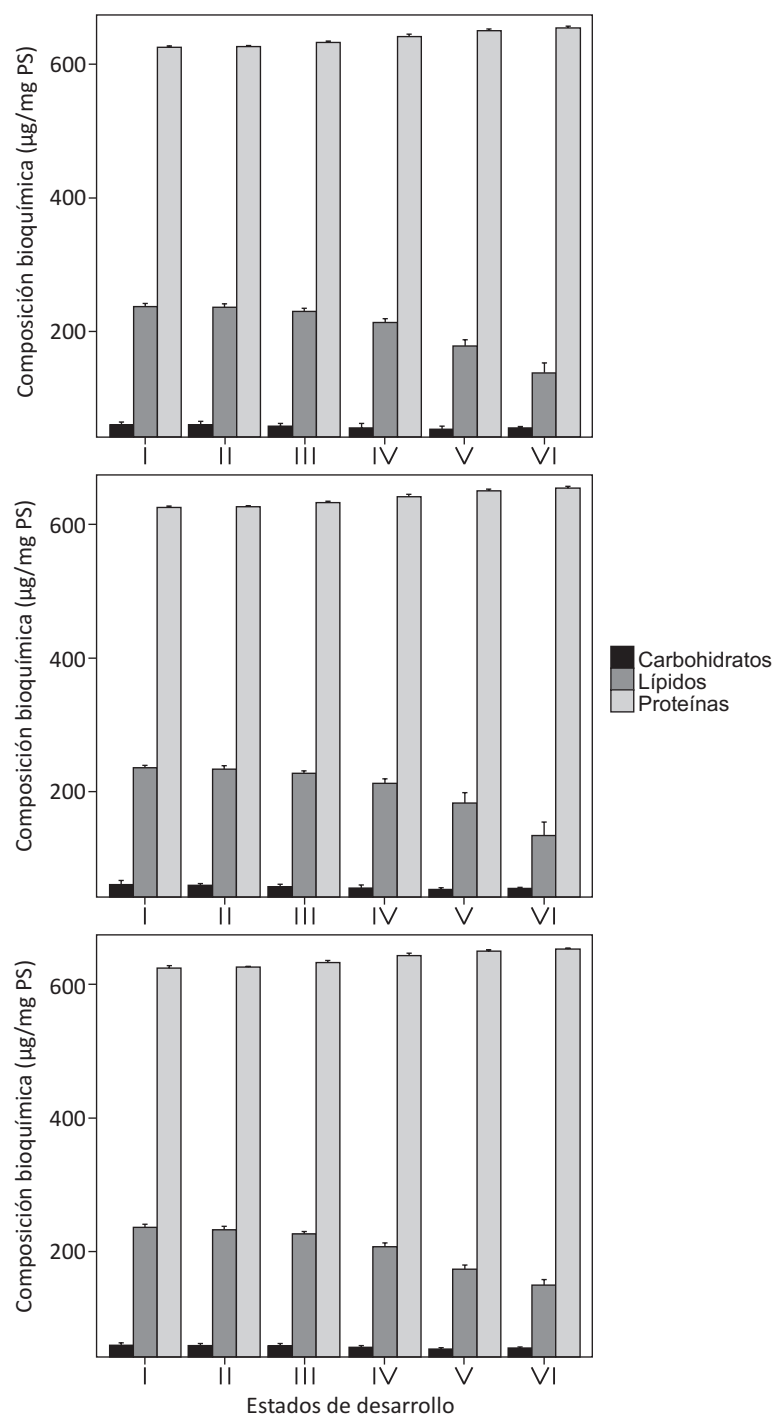


Fig. 5.14. Cambios en el contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos por mg de tejido ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) a lo largo del desarrollo embrionario de la primera (arriba), la segunda (centro) y la tercera (abajo) puestas consecutivas de *M. brachydactyla*.

En cambio, el contenido de proteínas se incrementó ligeramente, con valores iniciales (estado I) entre $623.4 \pm 2.98 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (2ª puesta) y $626.2 \pm 1.67 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (1ª puesta) hasta valores finales entre $650.8 \pm 2.04 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (2ª puesta) y $654.9 \pm 2.87 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (1ª puesta) (Fig. 5.14, Tablas 5.9 y 5.10). El incremento más alto se observó entre los estados III y IV de desarrollo, donde se produjo un aumento entre 1.35% (1ª puesta) y 1.70% (2ª puesta). Por otro lado, la relación C/N mostró diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) a lo largo del desarrollo embrionario, siendo los estados V y VI los que presentaron valores más bajos para esta relación, con un valor medio de 4.0 ± 0.10 para el estado V y de 3.7 ± 0.06 para el estado VI.

El contenido energético, en términos de energía^s y de energía^w, fue descendiendo de forma significativa (ANOVA, $p < 0.001$) a lo largo del desarrollo embrionario, sobre todo entre los estados IV y VI de desarrollo, donde se produjo el descenso más acusado, ya que durante ese periodo fue consumida en torno al $11.6 \pm 0.18\%$ de energía^s y $10.4 \pm 1.76\%$ de la energía^w (Fig 5.15, Tablas 5.9 y 5.10).

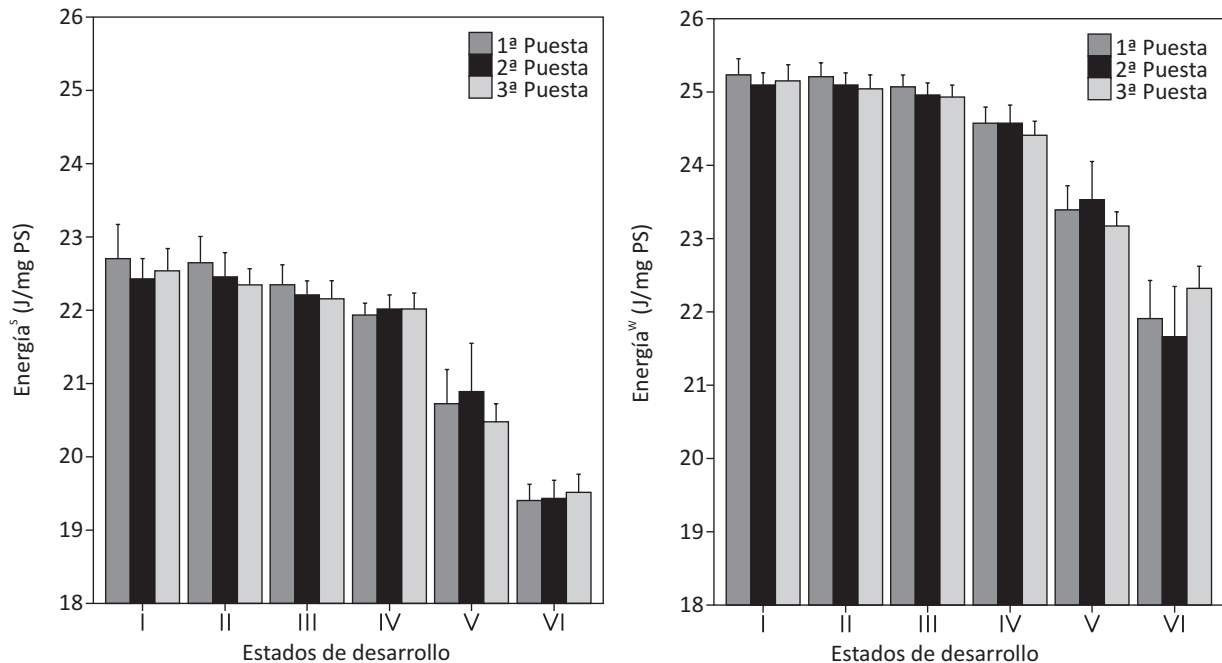


Fig. 5.15. Cambios en el contenido de energía^s (izquierda) y de energía^w (derecha) por mg de tejido ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) a lo largo del desarrollo embrionario en tres puestas consecutivas de *M. brachydactyla*.

Para la totalidad del desarrollo, la composición bioquímica, la relación C/N y el contenido energético mostró diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.01$ para energía^w y $p < 0.001$ para el resto) entre puestas sucesivas (Figs. 5.13 a 5.15, Tablas 5.9 y 5.10), excepto para los carbohidratos. La primera puesta presentó los valores medios más bajos de carbono ($468.4 \pm 26.80 \mu\text{g}/\text{mg PS}$), lípidos ($203.2 \pm 37.38 \mu\text{g}/\text{mg PS}$), relación C/N (4.23 ± 0.31) y de contenido energético ($21.5 \pm 1.24 \text{ J}/\text{mg PS}$ de energía^s y $24.1 \pm 1.27 \text{ J}/\text{mg PS}$ de energía^w) y a su vez, los más altos de proteínas ($640.3 \pm 11.13 \mu\text{g}/\text{mg PS}$). Para cinco de las variables, carbono, lípidos, proteínas, energía^s y energía^w, la interacción puesta-estado de desarrollo mostró diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$ para carbono, proteínas y energía^s y $p < 0.001$ para lípidos y energía^w), observándose las mayores diferencias en el carbono y la energía^s en los estados iniciales (estado I a III) y para el resto de variables en el estado VI, observándose los mayores valores de proteínas en la primera puesta ($654.9 \pm 2.87 \mu\text{g}/\text{mg PS}$) y de lípidos y energía^w en la tercera puesta ($149.7 \pm 8.29 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ y $22.3 \pm 0.31 \text{ J}/\text{mg PS}$, respectivamente).

Los huevos en estado I de cuatro puestas consecutivas mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$ para carbono y energía^s y $p < 0.001$ para el resto) en la composición bioquímica y energética por mg de tejido, a excepción de los carbohidratos y de la relación C/N (Tabla 5.9). Se observó que los huevos recién desovados de la cuarta puesta presentaron los valores más bajos en todas las variables y sus mayores diferencias se apreciaron con los huevos recién desovados de la primera puesta, con una diferencia de 1.48% para el carbono, 3.8% para los lípidos, 1.6% para las proteínas, 1.6% para la energía^s y 2.1% para la energía^w.

Tabla 5.9. Variaciones en el contenido de carbono (C), relación C/N, lípidos (lip), proteínas (prot), carbohidratos (carbo), energía^s y energía^w por mg de tejido (μg/mg PS o J/mg PS) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado I al VI (si es significativo) del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1^a, 2^a, 3^a) de *M. brachydactyla*. Se incluyen los datos de la cuarta puesta en la que solo se tiene el estado I. En cada variable se representan los valores de la media ± desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo y puestas (test post-hoc de Tukey, p<0.05).

Estado de desarrollo embrionario

| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado V | Estado VI | % Incremento |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------|
| 1ª Puesta | | | | | | | |
| C (μg/mg PS) | 492.74 ± 9.43 ^a | 492.04 ± 8.17 ^{ab} | 485.49 ± 6.29 ^{abcd} | 477.05 ± 3.77 ^d | 450.67 ± 10.66 ^e | 421.71 ± 5.42 ^f | -14.42 |
| Relación C/N | 4.55 ± 0.09 ^a | 4.53 ± 0.08 ^{ab} | 4.43 ± 0.06 ^{bc} | 4.30 ± 0.03 ^e | 4 ± 0.10 ^f | 3.72 ± 0.06 ^g | -18.24 |
| Lip (μg/mg PS) | 237.70 ± 4.65 ^a | 236.22 ± 5.27 ^{ab} | 230.04 ± 4.93 ^{ab} | 213.47 ± 6.02 ^c | 178.65 ± 9.32 ^d | 137.89 ± 15.06 ^{ef} | -41.99 |
| Prot (μg/mg PS) | 626.25 ± 1.67 ^{ef} | 627.30 ± 1.31 ^e | 633.42 ± 1.77 ^d | 642 ± 3.51 ^c | 651.05 ± 2.62 ^b | 654.95 ± 2.87 ^a | 4.58 |
| Carbo (μg/mg PS) | 60.17 ± 4.14 ^{ab} | 60.58 ± 4.92 ^a | 58.46 ± 3.71 ^{abc} | 55.72 ± 6.75 ^{abc} | 53.85 ± 4.35 ^c | 55.76 ± 2.07 ^{abc} | -7.33 |
| Energía ^s (J/mg PS) | 22.70 ± 0.49 ^a | 22.63 ± 0.38 ^{ab} | 22.33 ± 0.29 ^{abcd} | 21.94 ± 0.17 ^d | 20.73 ± 0.49 ^e | 19.40 ± 0.25 ^f | -14.54 |
| Energía ^w (J/mg PS) | 25.20 ± 0.23 ^{ab} | 25.21 ± 0.21 ^{ab} | 25.07 ± 0.18 ^a | 24.57 ± 0.23 ^{ab} | 23.38 ± 0.36 ^c | 21.89 ± 0.55 ^{de} | -13.27 |
| C (%) PS) | 49.35 ± 1.02 | 49.20 ± 0.77 | 48.55 ± 0.61 | 47.70 ± 0.36 | 45.07 ± 1.04 | 42.17 ± 0.52 | |
| Lip (%) PS) | 23.77 ± 0.45 | 23.62 ± 0.50 | 23 ± 0.48 | 21.35 ± 0.58 | 17.86 ± 0.91 | 13.79 ± 1.46 | |
| Prot (%) PS) | 62.63 ± 0.16 | 62.73 ± 0.12 | 63.34 ± 0.17 | 64.20 ± 0.34 | 65.11 ± 0.25 | 65.50 ± 0.28 | |
| Carbo (%) PS) | 6.02 ± 0.40 | 6.06 ± 0.46 | 5.85 ± 0.36 | 5.57 ± 0.65 | 5.39 ± 0.42 | 5.58 ± 0.20 | |
| 2ª Puesta | | | | | | | |
| C (μg/mg PS) | 487.34 ± 6.63 ^{abc} | 487.87 ± 7.69 ^{abc} | 482.51 ± 4.42 ^{bcd} | 478.80 ± 4.37 ^{cd} | 454 ± 15.25 ^e | 422.44 ± 5.70 ^f | -13.32 |
| Relación C/N | 4.52 ± 0.07 ^{ab} | 4.5 ± 0.07 ^{ab} | 4.41 ± 0.05 ^c | 4.30 ± 0.04 ^{de} | 4.04 ± 0.15 ^f | 3.75 ± 0.06 ^g | -17.03 |
| Lip (μg/mg PS) | 235.69 ± 4.11 ^{ab} | 234.04 ± 5.23 ^{ab} | 227.77 ± 3.36 ^b | 212.83 ± 6.29 ^c | 183.16 ± 15.57 ^d | 134.66 ± 19.75 ^f | -42.87 |
| Prot (μg/mg PS) | 623.45 ± 2.98 ^f | 626.77 ± 1.49 ^e | 632.68 ± 2.85 ^d | 643.41 ± 2.57 ^c | 649.47 ± 1.76 ^b | 650.82 ± 2.04 ^b | 4.39 |
| Carbo (μg/mg PS) | 60.87 ± 6.03 ^a | 59.85 ± 2.65 ^{ab} | 57.62 ± 3.49 ^{abc} | 55.86 ± 4.33 ^{abc} | 53.58 ± 2.72 ^c | 55.11 ± 1.75 ^{abc} | -9.46 |
| Energía ^s (J/mg PS) | 22.42 ± 0.31 ^{abc} | 22.44 ± 0.35 ^{abc} | 22.20 ± 0.20 ^{bcd} | 22.03 ± 0.20 ^{cd} | 20.88 ± 0.70 ^e | 19.43 ± 0.26 ^f | -13.34 |
| Energía ^w (J/mg PS) | 25.10 ± 0.18 ^{ab} | 25.10 ± 0.18 ^{ab} | 24.95 ± 0.17 ^{ab} | 24.58 ± 0.26 ^{ab} | 23.51 ± 0.57 ^c | 21.65 ± 0.73 ^e | -13.74 |
| C (%) PS) | 48.73 ± 0.65 | 48.79 ± 0.74 | 48.25 ± 0.43 | 47.88 ± 0.41 | 45.40 ± 1.47 | 42.24 ± 0.53 | |
| Lip (%) PS) | 23.57 ± 0.41 | 23.40 ± 0.50 | 22.78 ± 0.33 | 21.28 ± 0.60 | 18.32 ± 1.50 | 13.47 ± 1.85 | |
| Prot (%) PS) | 62.35 ± 0.29 | 62.68 ± 0.14 | 63.27 ± 0.28 | 64.34 ± 0.24 | 64.95 ± 0.17 | 65.08 ± 0.19 | |
| Carbo (%) PS) | 6.09 ± 0.60 | 5.99 ± 0.26 | 5.76 ± 0.34 | 5.59 ± 0.41 | 5.36 ± 0.26 | 5.51 ± 0.16 | |

Tabla 5.9. Variaciones en el contenido de carbono (C), relación C/N, lípidos (lip), proteínas (prot), carbohidratos (carbo), energía^w y energía^s por mg de tejido (μg/mg PS o J/mg PS) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado I al VI (si es significativo) del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1^a, 2^a, 3^a) de *M. brachydictyla*. Se incluyen los datos de la cuarta puesta en la que solo se tiene el estado I. En cada variable se representan los valores de la media ± desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo y puestas (test post-hoc de Tukey, p<0.05) (continuación).

| Estado de desarrollo embrionario | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado V | Estado VI |
| 3ª Puesta | | | | | | |
| C (μg/mg PS) | 490.24 ± 6.86 ^{ab} | 485.79 ± 5.07 ^{abcd} | 481.44 ± 5.50 ^{bcd} | 478.58 ± 4.83 ^{cd} | 444.85 ± 5.98 ^e | 423.90 ± 6.08 ^f |
| Relación C/N | 4.53 ± 0.07 ^a | 4.48 ± 0.05 ^{abc} | 4.40 ± 0.06 ^{cd} | 4.30 ± 0.05 ^e | 3.95 ± 0.06 ^f | 3.75 ± 0.06 ^g |
| Lip (μg/mg PS) | 236.54 ± 4.55 ^{ab} | 232.82 ± 4.98 ^{ab} | 226.79 ± 3.61 ^b | 207.52 ± 5.64 ^c | 173.76 ± 6.26 ^d | 149.71 ± 8.29 ^e |
| Prot (μg/mg PS) | 625.11 ± 3.38 ^{ef} | 626.42 ± 1.29 ^{ef} | 633.17 ± 3.13 ^d | 643.75 ± 3.28 ^c | 650.47 ± 2.14 ^b | 653.31 ± 1.92 ^{ab} |
| Carbo (μg/mg PS) | 59.86 ± 3.63 ^{ab} | 59.22 ± 2.98 ^{abc} | 58.60 ± 3.91 ^{abc} | 56.59 ± 2.73 ^{abc} | 53.98 ± 1.96 ^{bc} | 55.60 ± 1.40 ^{abc} |
| Energía ^s (J/mg PS) | 22.55 ± 0.32 ^{ab} | 22.34 ± 0.23 ^{abcd} | 22.15 ± 0.25 ^{bcd} | 22.02 ± 0.22 ^{cd} | 20.46 ± 0.28 ^e | 19.50 ± 0.28 ^f |
| Energía ^w (J/mg PS) | 25.16 ± 0.23 ^{ab} | 25.03 ± 0.20 ^{ab} | 24.94 ± 0.17 ^{ab} | 24.39 ± 0.22 ^{ab} | 23.17 ± 0.21 ^c | 22.32 ± 0.31 ^d |
| C (%) PS | 49.02 ± 0.67 | 48.58 ± 0.48 | 48.14 ± 0.53 | 47.86 ± 0.46 | 44.49 ± 0.55 | 42.32 ± 0.58 |
| Líp (%) PS | 23.65 ± 0.45 | 23.28 ± 0.47 | 22.68 ± 0.35 | 20.75 ± 0.54 | 17.38 ± 0.58 | 14.97 ± 0.78 |
| Prot (%) PS | 62.51 ± 0.33 | 62.64 ± 0.12 | 63.32 ± 0.30 | 64.38 ± 0.31 | 65.05 ± 0.20 | 65.33 ± 0.18 |
| Carbo (%) PS | 5.99 ± 0.36 | 5.92 ± 0.28 | 5.86 ± 0.38 | 5.66 ± 0.26 | 5.40 ± 0.18 | 5.56 ± 0.13 |
| 4ª Puesta | | | | | | |
| C (μg/mg PS) | 485.44 ± 5.31 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Relación C/N | 4.57 ± 0.07 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Lip (μg/mg PS) | 228.76 ± 2.84 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Prot (μg/mg PS) | 616.28 ± 1.70 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Carbo (μg/mg PS) | 56.37 ± 1.30 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Energía ^s (J/mg PS) | 22.33 ± 0.24 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Energía ^w (J/mg PS) | 24.58 ± 0.13 | --- | --- | --- | --- | --- |
| C (%) PS | 48.54 ± 0.54 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Líp (%) PS | 22.88 ± 0.28 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Prot (%) PS | 61.63 ± 0.17 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Carbo (%) PS | 5.64 ± 0.13 | --- | --- | --- | --- | --- |

Tabla 5.10. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido de carbono (C), relación C/N, lípidos (Lip), proteínas (Prot), carbohidratos (Carbo), energía^s y energía^w a lo largo del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1ª, 2ª y 3ª) de *M.brachydactyla*. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|--------------------------------|-------------------|-----|--------|--------|--------|
| C (µg/mg PS) | Puesta | 2 | 2305 | 43.16 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 26269 | 491.99 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 102 | 1.91 | <0.05 |
| | Error | 254 | 53 | | |
| Relación C/N | Puesta | 2 | 0.48 | 95.14 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 3.71 | 742.78 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 0.01 | 1.49 | 0.14 |
| | Error | 254 | 0.01 | | |
| Lip (µg/mg PS) | Puesta | 2 | 6266 | 101.37 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 54347 | 879.21 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 192 | 3.11 | <0.001 |
| | Error | 254 | 62 | | |
| Prot (µg/mg PS) | Puesta | 2 | 1536 | 220.75 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 5962 | 856.84 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 14 | 1.95 | <0.05 |
| | Error | 254 | 7 | | |
| Carbo (µg/mg PS) | Puesta | 2 | 30.53 | 1.79 | 0.17 |
| | Estado desarrollo | 5 | 315.59 | 18.55 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 5.26 | 0.31 | 0.98 |
| | Error | 254 | 17.01 | | |
| Energía ^s (J/mg PS) | Puesta | 2 | 4.89 | 43.18 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 55.59 | 491.29 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 0.22 | 1.91 | <0.05 |
| | Error | 254 | 0.11 | | |
| Energía ^w (J/mg PS) | Puesta | 2 | 0.19 | 5.04 | <0.01 |
| | Estado desarrollo | 5 | 9.58 | 252.30 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 0.13 | 3.43 | <0.001 |
| | Error | 254 | 0.04 | | |

Tabla 5.11. Resultados de las ANOVAS de una vía evaluando las diferencias en el contenido de carbono (C), relación C/N, lípidos (Lip), proteínas (Prot), carbohidratos (Carbo), energía^s y energía^w de los huevos en estado I entre puestas consecutivas (1ª, 2ª, 3ª y 4ª) de *M.brachydactyla*. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|--------------------------------|--------|----|--------|-------|--------|
| C (µg/mg PS) | Puesta | 3 | 150.32 | 2.98 | <0.05 |
| | Año | 82 | 50.42 | | |
| Relación C/N | Puesta | 3 | 0.01 | 1.82 | 0.15 |
| | Año | 82 | 0.00 | | |
| Lip (µg/mg PS) | Puesta | 3 | 168.34 | 9.42 | <0.001 |
| | Error | 82 | 17.87 | | |
| Prot (µg/mg PS) | Puesta | 3 | 212.99 | 26.37 | <0.001 |
| | Error | 82 | 8.08 | | |
| Carbo (µg/mg PS) | Puesta | 3 | 49.39 | 2.13 | 0.10 |
| | Error | 82 | 23.14 | | |
| Energía ^s (J/mg PS) | Puesta | 3 | 0.38 | 3.29 | <0.05 |
| | Año | 82 | 0.11 | | |
| Energía ^w (J/mg PS) | Puesta | 3 | 0.91 | 22.70 | <0.001 |
| | Error | 82 | 0.04 | | |

5.3.5. Composición de ácidos grasos

Para el estudio del contenido de los ácidos grasos a lo largo del desarrollo embrionario se analizaron las dos primeras puestas del cultivo de *M. brachydactyla*.

5.3.5.1. Perfil de ácidos grasos

El análisis del perfil de ácidos grasos a lo largo del desarrollo embrionario mostró la presencia de un total de 32 ácidos grasos pertenecientes a cuatro grupos: ácidos grasos saturados (SFA; agrupa a 8 ácidos grasos), ácidos grasos ramificados (BFA; agrupa a 4 ácidos grasos), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA; agrupa a 10 ácidos grasos) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA; agrupa a 10 ácidos grasos) (Anexo, Tabla 2.1). Este perfil de ácidos grasos se mantuvo sin variaciones a nivel cualitativo a lo largo de todo el desarrollo embrionario.

5.3.5.2. Composición por grupos de ácidos grasos

El contenido total de ácidos grasos por mg de tejido ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) presentó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) a lo largo de la embriogénesis, con un descenso total en torno a un 30% al final del desarrollo. El descenso más pronunciado se produjo en la segunda mitad del desarrollo, entre el estado III y V, con una bajada del 20.4% de media. La comparación entre puestas para la totalidad del desarrollo mostró diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) en el contenido total de ácidos grasos por mg de tejido, siendo la segunda puesta la que presentó los valores más altos ($139.5 \pm 15.85 \mu\text{g}/\text{mg PS}$) (Tablas 5.12 y 5.14).

Por grupos de ácidos grasos, el que presentó mayores valores al comienzo del desarrollo fue el de los ácidos grasos poliinsaturados ($65.2 \pm 1.23 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (2ª puesta) y $67.2 \pm 1.01 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (1ª puesta)), seguido por los saturados ($42.8 \pm 2.47 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (2ª puesta) y $43.0 \pm 1.50 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (1ª puesta)) y los monoinsaturados ($42.0 \pm 1.06 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (2ª puesta) y $43.0 \pm 0.89 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (1ª puesta)) (Tablas 5.12 y 5.14). Para los tres grupos, se apreció un descenso significativo (ANOVA, $p < 0.001$) a lo largo del desarrollo embrionario. El mayor descenso se observó en los ácidos grasos saturados, con un $42.5 \pm 0.15\%$ de descenso medio, mientras que los monoinsaturados bajaron una media de $34.9 \pm 2.35\%$ y los poliinsaturados en torno al $22.4 \pm 0.41\%$ (Fig. 5.16).

En cuanto a las diferencias entre puestas para la totalidad del desarrollo, los tres grupos mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre puestas consecutivas (Tablas 5.12 y 5.14). La segunda puesta fue la que presentó mayores valores de los tres grupos, con $38.3 \pm 6.21 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para SFA, $38.2 \pm 4.93 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para MUFA y $61.3 \pm 5.42 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para PUFA. Los monoinsaturados y los poliinsaturados mostraron una interacción significativa (ANOVA, $p < 0.01$ para MUFA y $p < 0.001$ para PUFA) puesta-estado de desarrollo. Los poliinsaturados presentaron las mayores diferencias en los estados I, II y III, con mayores valores en la primera puesta para los tres estados de desarrollo embrionario ($67.2 \pm 1.01 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (estado I), $66.5 \pm 0.29 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (estado II), $64.4 \pm 1.19 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (estado III)).

5.3.5.3. Composición de los principales ácidos grasos

A continuación, para analizar las variaciones durante la embriogénesis en el contenido de ácidos grasos individuales, se seleccionaron los principales ácidos grasos presentes en los huevos recién desovados. El criterio empleado fue la proporción frente al total de ácidos grasos, tomándose solamente aquellos que se encontraban en una proporción superior al 1% en alguno de los estados de desarrollo embrionario. Los ácidos grasos seleccionados fueron: 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0 en el grupo de saturados, 16:1w7, 18:1w7, 18:1w9, 20:1w9 en el grupo de los monoinsaturados y 18:2w6, 20:4w6, 20:5w3, 22:6w3 en el

grupo de los poliinsaturados. El 18:3w3 fue seleccionado también a pesar de encontrarse en una proporción por debajo del 1% del total de ácidos grasos. La razón de su selección fue para permitir su comparación con los valores obtenidos en los huevos recién desovados de medio natural (capítulo anterior), donde este ácido graso se encontraba en proporciones mayores al 1%.

5.3.5.3.1. Ácidos grasos saturados

En general, los ácidos grasos saturados individuales disminuyeron significativamente (ANOVA, $p < 0.001$) durante el desarrollo embrionario (Tablas 5.12 y 5.14). Entre el estado IV y el VI se observó el mayor descenso del contenido en 14:0 y en 16:0, en torno al $39.3 \pm 0.64\%$ y al $35.5 \pm 1.77\%$, respectivamente. Para el contenido en 18:0 se apreciaron dos momentos de mayor descenso, entre el estado II y III ($8.4 \pm 0.11\%$) y el estado IV y V ($9.02 \pm 0.24\%$). También cabe destacar el hecho de que el contenido en 15:0 se incrementó entre el estado I y II de desarrollo ($1.8 \pm 0.01\%$) y luego descendió paulatinamente hasta el final del desarrollo ($10.4 \pm 1.22\%$).

Entre puestas, para la totalidad del desarrollo se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.01$ para 15:0 y $p < 0.001$ para el resto) en todos los ácidos grasos saturados por mg de tejido (Tablas 5.12 y 5.14). La primera puesta presentó los valores más bajos para estas cuatro variables. Solamente se apreciaron diferencias en la interacción entre puesta-estado de desarrollo para el contenido en 18:0, ya que el estado I tiene un contenido significativamente (ANOVA, $p < 0.05$) mayor en las primeras puestas ($8.6 \pm 0.23 \mu\text{g}/\text{mg PS}$).

5.3.5.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados

En cuanto a los monoinsaturados, el contenido de los ácidos grasos individuales varió significativamente (ANOVA, $p < 0.001$) durante el desarrollo (Tablas 5.12 y 5.14). Se observaron dos tendencias, la del 20:1w9, que disminuyó en los primeros estados de desarrollo (estado I al III), hasta un máximo de 16.3%, y luego se incrementó hasta el final del desarrollo (estado VI), entre un 35.3% y un 55.2%, y la del resto que disminuyó paulatinamente a lo largo del desarrollo, con valores entre el 27.7% del 18:1w7 (2ª puesta) y el 48.6% del 18:1w9 (1ª puesta). En el contenido en 16:1w7 y en 18:1w7, los mayores descensos se observaron en los momentos finales del desarrollo, entre el estado V y el estado VI (en torno al $17 \pm 3.26\%$ y al $13.3 \pm 0.42\%$, respectivamente). En cambio, en el contenido en 18:1w9, los mayores descensos se observaron entre el estado III y el V, donde se observó una disminución en torno al $41.1 \pm 1.93\%$.

Para la totalidad del desarrollo las puestas mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) en el contenido de 16:1w7 y 18:1w9 por mg de tejido, siendo las primeras puestas las que presentaron menores valores de estas dos variables ($10.5 \pm 1.75 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ y $13.7 \pm 3.60 \mu\text{g}/\text{mg PS}$, respectivamente) (Tablas 5.12 y 5.14). Se apreciaron diferencias en la interacción entre puesta y estado de desarrollo en el 16:1w7 (ANOVA, $p < 0.001$), donde el estado I fue mayor en la primera puesta ($12.8 \pm 0.37 \mu\text{g}/\text{mg PS}$); en el 18:1w7 (ANOVA, $p < 0.05$), donde todos los estados (I, II, III, IV, V, VI) fueron mayores en las primeras puestas; en el 18:1w9 (ANOVA, $p < 0.05$), donde los estados V y VI fueron mayores en las segundas puestas; y en el 20:1w9 (ANOVA, $p < 0.05$), donde el estado III fue mayor en la segunda puesta ($1.0 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{mg PS}$).

5.3.5.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados

En los ácidos grasos poliinsaturados, el contenido de 18:2w6, 18:3w3, 20:4w6, 20:5w3 y 22:6w3 del tejido ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) fue significativamente diferente (ANOVA, $p < 0.001$) entre estados de desarrollo embrionario (Tablas 5.12 y 5.14). De tal manera que, en el contenido de 18:2w6 y de 18:3w3 se observaron los descensos más acusados desde la mitad (estado III) hasta el final del desarrollo (estado VI), con disminuciones de hasta el 32% entre estados. Mientras que, los mayores descensos del contenido de 20:5w3 y de 22:6w3 ocurrieron entre el estado III y el estado V, donde se produjo una disminución media del $13.6 \pm 2.55\%$ y el $23.2 \pm 0.05\%$, respectivamente. En el caso del 20:4w6, la disminución más intensa se observó entre el estado IV y el VI, donde el descenso fue del $15.6 \pm 6.28\%$ de media.

Entre puestas para la totalidad del desarrollo, todos los ácidos grasos poliinsaturados presentaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$). La primera puesta presentó los contenidos más elevados de 20:4w6 ($2.77 \pm 0.29 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS) y los más bajos de los otros cuatro poliinsaturados. Se apreciaron diferencias en la interacción entre puesta-estado de desarrollo en el 20:4w6 (ANOVA, $p < 0.05$), donde los estados IV, V y VI fueron mayores en la primera puesta, en el 20:5w3 (ANOVA, $p < 0.001$), donde los estados III fueron más elevados en la primera puesta ($31.6 \pm 0.59 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS) y en el 22:6w3 (ANOVA, $p < 0.01$), donde el estado VI fue más alto en la primera puesta ($19.9 \pm 0.25 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS).

En cuanto a las relaciones, la relación w3/w6 y la relación 18:1w7/18:1w9 fueron las que presentaron incrementos mayores de hasta el 40% a lo largo del desarrollo (Tabla 5.13). La relación 20:5w3/22:6w3 se mantuvo sin cambios o descendió ligeramente, mientras que la relación 20:5w3/20:4w6 se incrementó o se mantuvo sin oscilaciones. Para la totalidad del desarrollo, las primeras puestas mostraron una menor relación w3/w6 y 20:5w3/20:4w6, sin embargo se observaron valores más elevados de la relación 18:1w7/18:1w9.

Tabla 5.13. Variaciones en las relaciones w3/w6, 18:1w7/18:1w9, 20:5w3/20:4w6 y 20:5w3/22:6w3 junto con su incremento (%) desde el estado I al VI (si es significativo) del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1ª y 2ª) de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo y puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Estado de desarrollo embrionario | | | | | | | |
|----------------------------------|---------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado V | Estado VI | % Incremento |
| 1ª Puesta | w3/w6 | 9.30 ± 0.29^h | 9.36 ± 0.17^{gh} | 9.87 ± 0.33^{fg} | 10.16 ± 0.19^{ef} | 10.62 ± 0.32^{cd} | 26.45 |
| | 18:1w7/18:1w9 | 0.50 ± 0.04^{ef} | 0.50 ± 0.01^{ef} | 0.52 ± 0.01^e | 0.58 ± 0.01^d | 0.78 ± 0.01^a | 40.00 |
| | 20:5w3/22:6w3 | 1.34 ± 0.03^b | 1.33 ± 0.01^b | 1.30 ± 0.01^b | 1.31 ± 0.04^b | 1.44 ± 0.01^a | -2.99 |
| | 20:5w3/20:4w6 | 10.43 ± 0.53^c | 10.63 ± 0.27^c | 10.93 ± 0.42^c | 10.71 ± 0.33^c | 10.50 ± 0.29^c | |
| 2ª Puesta | w3/w6 | 9.92 ± 0.43^f | 10.15 ± 0.27^{ef} | 10.28 ± 0.39^{de} | 10.86 ± 0.45^c | 11.64 ± 0.44^b | 33.17 |
| | 18:1w7/18:1w9 | 0.48 ± 0.02^f | 0.47 ± 0.02^f | 0.49 ± 0.02^f | 0.58 ± 0.04^d | 0.72 ± 0.06^b | 33.33 |
| | 20:5w3/22:6w3 | 1.34 ± 0.07^b | 1.33 ± 0.02^b | 1.26 ± 0.02^c | 1.32 ± 0.01^b | 1.45 ± 0.02^a | |
| | 20:5w3/20:4w6 | 12.49 ± 1.00^b | 12.95 ± 0.31^{ab} | 12.52 ± 1.06^b | 12.41 ± 0.47^b | 13.02 ± 0.47^{ab} | 10.89 |

Tabla 5.12. Variaciones del contenido en los principales ácidos grasos por mg de tejido ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) junto con su incremento (%) desde el estado I al VI (si es significativo) del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1ª y 2ª) de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo y puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Estado de desarrollo embrionario | | | | | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado V | Estado VI | % Incremento |
| 14:0 | 4.60 \pm 0.31 ^a | 4.50 \pm 0.28 ^a | 3.93 \pm 0.36 ^b | 3.42 \pm 0.18 ^c | 2.67 \pm 0.27 ^{de} | 2.06 \pm 0.13 ^f | -55.22 |
| 15:0 | 1.65 \pm 0.07 ^{abc} | 1.68 \pm 0.06 ^{ab} | 1.64 \pm 0.07 ^{abc} | 1.58 \pm 0.05 ^{bcd} | 1.56 \pm 0.07 ^{cd} | 1.52 \pm 0.05 ^d | |
| 16:0 | 27.17 \pm 1.34 ^a | 27.08 \pm 1.71 ^a | 25.34 \pm 0.87 ^a | 21.20 \pm 1.08 ^b | 17.53 \pm 0.95 ^c | 13.93 \pm 0.97 ^d | -48.73 |
| 18:0 | 8.57 \pm 0.23 ^a | 8.26 \pm 0.32 ^b | 7.56 \pm 0.15 ^c | 7.12 \pm 0.13 ^d | 6.49 \pm 0.16 ^{ef} | 6.26 \pm 0.17 ^f | -26.95 |
| Σ SFA | 43.02 \pm 1.50 ^a | 42.48 \pm 1.91 ^a | 39.42 \pm 0.90 ^b | 34.34 \pm 1.30 ^c | 29.20 \pm 1.44 ^d | 24.69 \pm 1.25 ^e | -42.61 |
| 16:1w7 | 12.82 \pm 0.37 ^a | 11.74 \pm 0.12 ^d | 11.76 \pm 0.37 ^d | 10.45 \pm 0.19 ^e | 9.44 \pm 0.23 ^f | 7.62 \pm 0.32 ^g | -40.56 |
| 18:1w7 | 8.99 \pm 0.43 ^a | 8.72 \pm 0.18 ^b | 8.55 \pm 0.08 ^b | 7.84 \pm 0.09 ^e | 7.42 \pm 0.13 ^f | 6.41 \pm 0.19 ^h | -28.70 |
| 18:1w9 | 17.85 \pm 0.62 ^a | 17.33 \pm 0.24 ^{ab} | 16.54 \pm 0.18 ^b | 13.49 \pm 0.36 ^c | 9.51 \pm 0.13 ^{de} | 9.18 \pm 0.09 ^e | -48.57 |
| 20:1w9 | 1.04 \pm 0.12 ^{de} | 0.94 \pm 0.07 ^{ef} | 0.87 \pm 0.11 ^f | 0.99 \pm 0.10 ^{ef} | 1.21 \pm 0.11 ^{bc} | 1.35 \pm 0.07 ^a | 29.81 |
| Σ MUFA | 42.98 \pm 0.89 ^a | 40.98 \pm 0.45 ^{bc} | 39.94 \pm 0.68 ^c | 34.94 \pm 0.57 ^d | 30.75 \pm 0.36 ^e | 27.26 \pm 0.58 ^f | -36.58 |
| 18:2w6 | 2.82 \pm 0.10 ^a | 2.81 \pm 0.04 ^a | 2.56 \pm 0.11 ^b | 2.05 \pm 0.15 ^c | 1.39 \pm 0.07 ^d | 1.12 \pm 0.12 ^e | -60.28 |
| 18:3w3 | 1.37 \pm 0.08 ^a | 1.34 \pm 0.06 ^{ab} | 1.25 \pm 0.07 ^b | 1.02 \pm 0.09 ^c | 0.80 \pm 0.08 ^d | 0.71 \pm 0.04 ^e | -48.18 |
| 20:4w6 | 3.19 \pm 0.14 ^a | 3.09 \pm 0.08 ^{ab} | 2.90 \pm 0.16 ^b | 2.68 \pm 0.06 ^c | 2.55 \pm 0.10 ^{cd} | 2.38 \pm 0.08 ^e | -25.39 |
| 20:5w3 | 33.27 \pm 0.79 ^a | 32.86 \pm 0.20 ^{ab} | 31.64 \pm 0.59 ^c | 28.68 \pm 0.30 ^e | 26.77 \pm 0.39 ^f | 25.85 \pm 0.23 ^g | -22.30 |
| 22:6w3 | 24.76 \pm 0.21 ^a | 24.64 \pm 0.06 ^a | 24.32 \pm 0.27 ^a | 21.94 \pm 0.73 ^b | 18.66 \pm 0.34 ^d | 19.94 \pm 0.25 ^c | -19.47 |
| Σ PUFA | 67.19 \pm 1.01 ^a | 66.52 \pm 0.29 ^a | 64.40 \pm 1.19 ^b | 58.11 \pm 1.17 ^d | 52.22 \pm 0.97 ^e | 51.96 \pm 0.21 ^{ef} | -22.67 |
| Σ TOTALES | 154.53 \pm 2.34 ^a | 151.33 \pm 1.99 ^{ab} | 145.11 \pm 2.20 ^c | 128.73 \pm 2.95 ^d | 114.80 \pm 2.73 ^e | 106.13 \pm 1.97 ^f | -31.32 |
| 14:0 | 4.83 \pm 0.44 ^a | 4.66 \pm 0.45 ^a | 3.98 \pm 0.61 ^b | 3.50 \pm 0.18 ^{bc} | 2.84 \pm 0.42 ^d | 2.14 \pm 0.25 ^{ef} | -55.69 |
| 15:0 | 1.66 \pm 0.11 ^{ab} | 1.69 \pm 0.09 ^a | 1.65 \pm 0.10 ^{ab} | 1.59 \pm 0.07 ^{abcd} | 1.57 \pm 0.05 ^{bcd} | 1.50 \pm 0.05 ^d | |
| 16:0 | 26.96 \pm 2.29 ^a | 26.93 \pm 2.24 ^a | 25.58 \pm 0.93 ^a | 21.93 \pm 1.71 ^b | 17.96 \pm 1.61 ^c | 13.86 \pm 1.10 ^d | -48.59 |
| 18:0 | 8.31 \pm 0.27 ^b | 8.17 \pm 0.31 ^b | 7.49 \pm 0.18 ^c | 7.18 \pm 0.13 ^d | 6.52 \pm 0.22 ^e | 6.24 \pm 0.11 ^f | -24.91 |
| Σ SFA | 42.77 \pm 2.47 ^a | 42.47 \pm 2.31 ^a | 39.62 \pm 1.30 ^b | 35.10 \pm 1.82 ^c | 29.76 \pm 2.09 ^d | 24.64 \pm 1.47 ^e | -42.39 |
| 16:1w7 | 12.33 \pm 0.54 ^b | 11.78 \pm 0.26 ^{cd} | 12.14 \pm 0.49 ^{bc} | 10.59 \pm 0.37 ^e | 9.48 \pm 0.28 ^f | 8.09 \pm 0.16 ^g | -34.39 |
| 18:1w7 | 8.51 \pm 0.12 ^{bc} | 8.35 \pm 0.09 ^c | 8.06 \pm 0.18 ^d | 7.44 \pm 0.18 ^f | 7.07 \pm 0.12 ^g | 6.15 \pm 0.16 ⁱ | -27.73 |
| 18:1w9 | 17.74 \pm 0.76 ^a | 17.65 \pm 0.62 ^a | 16.52 \pm 0.67 ^b | 12.95 \pm 1.36 ^c | 9.95 \pm 0.92 ^d | 9.70 \pm 0.71 ^{de} | -45.32 |
| 20:1w9 | 1.07 \pm 0.15 ^{de} | 1.04 \pm 0.13 ^{de} | 0.99 \pm 0.11 ^e | 1.04 \pm 0.13 ^{de} | 1.17 \pm 0.14 ^{cd} | 1.34 \pm 0.08 ^{ab} | 25.23 |
| Σ MUFA | 41.96 \pm 1.06 ^{ab} | 41.18 \pm 0.97 ^b | 40.07 \pm 0.92 ^c | 34.33 \pm 1.79 ^d | 30.97 \pm 1.17 ^e | 28.01 \pm 0.91 ^f | -33.25 |
| 18:2w6 | 2.78 \pm 0.09 ^a | 2.76 \pm 0.06 ^a | 2.55 \pm 0.14 ^b | 2.04 \pm 0.17 ^c | 1.44 \pm 0.14 ^d | 1.12 \pm 0.11 ^e | -59.71 |
| 18:3w3 | 1.35 \pm 0.10 ^a | 1.35 \pm 0.09 ^a | 1.24 \pm 0.06 ^b | 1.00 \pm 0.11 ^c | 0.78 \pm 0.08 ^{de} | 0.76 \pm 0.05 ^{de} | -43.70 |
| 20:4w6 | 2.61 \pm 0.23 ^c | 2.50 \pm 0.05 ^{cde} | 2.47 \pm 0.19 ^{de} | 2.34 \pm 0.11 ^e | 2.09 \pm 0.10 ^f | 1.87 \pm 0.05 ^f | -28.35 |
| 20:5w3 | 32.42 \pm 0.99 ^b | 32.42 \pm 0.41 ^b | 30.73 \pm 0.56 ^d | 28.99 \pm 0.26 ^e | 27.11 \pm 0.50 ^f | 25.89 \pm 0.21 ^g | -20.14 |
| 22:6w3 | 24.23 \pm 0.73 ^a | 24.33 \pm 0.25 ^a | 24.31 \pm 0.26 ^a | 22.05 \pm 0.25 ^b | 18.67 \pm 0.31 ^d | 19.24 \pm 0.07 ^d | -20.59 |
| Σ PUFA | 65.25 \pm 1.23 ^b | 65.21 \pm 0.47 ^b | 63.15 \pm 0.95 ^c | 58.22 \pm 0.83 ^d | 52.19 \pm 1.04 ^{ef} | 50.84 \pm 0.35 ^f | -22.08 |
| Σ TOTALES | 151.32 \pm 2.71 ^{ab} | 150.21 \pm 3.14 ^b | 144.19 \pm 2.36 ^c | 129 \pm 3.94 ^d | 115.55 \pm 4.14 ^e | 105.72 \pm 2.63 ^f | -30.13 |

Con respecto al grado de utilización de los ácidos grasos durante del desarrollo embrionario (Fig. 5.16), el 18:2w6 y el 14:0 fueron los más usados, con un consumo de casi el 60% al final del desarrollo. En general, se apreció un consumo de ácidos grasos, tanto por grupos como por ácidos grasos individuales, ligeramente mayor en la primera puesta, y preferentemente en el 16:1w7, del 18:1w9 y del 18:3w3. En cambio, la segunda puesta solamente mostró mayores consumos en el 15:0 y en el 20:4w6.

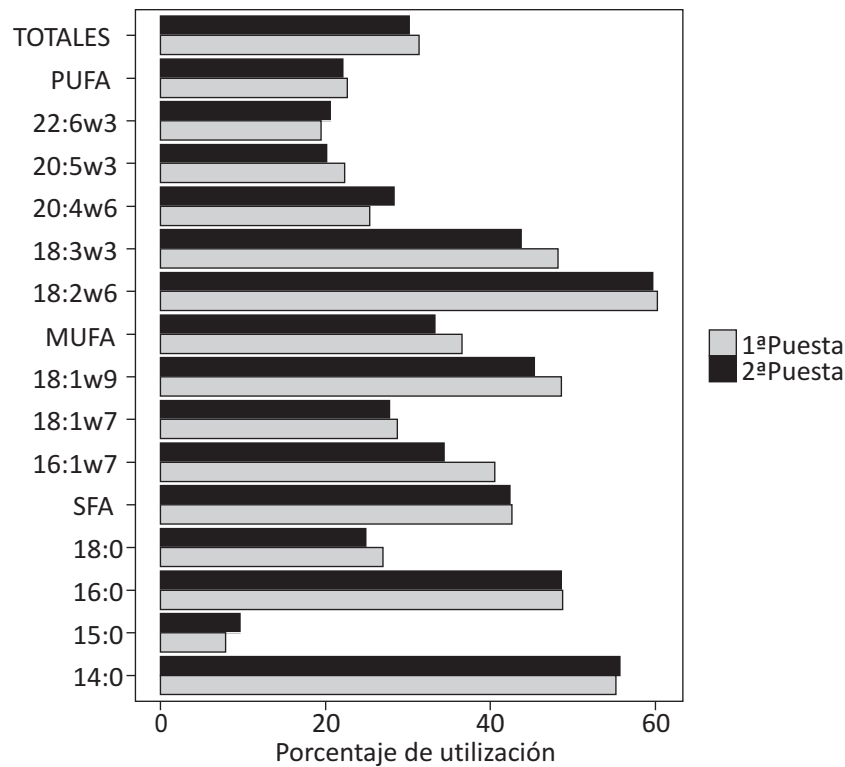


Fig. 5.16. Grado de utilización de los ácidos grasos a lo largo del desarrollo embrionario en la primera y la segunda puesta de *M. brachydactyla*.

Tabla 5.14. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido de ácidos grasos principales a lo largo del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1ª y 2ª) de *M.brachydactyla*. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|-------------------|-------------------|-----|---------|---------|--------|
| 14:0 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 20.56 | 141.56 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 30.42 | 209.50 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.05 | 0.34 | 0.89 |
| | Error | 185 | 0.15 | | |
| 15:0 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 0.062 | 10.34 | <0.01 |
| | Estado desarrollo | 5 | 0.109 | 18.15 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.001 | 0.21 | 0.96 |
| | Error | 185 | 0.006 | | |
| 16:0 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 340.40 | 142.09 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 804.20 | 335.64 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.90 | 0.37 | 0.87 |
| | Error | 185 | 2.40 | | |
| 18:0 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 8.00 | 174.18 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 22.35 | 486.59 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.11 | 2.30 | 0.05 |
| | Error | 185 | 0.05 | | |
| SFA (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 677.60 | 218.25 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 1510.80 | 486.60 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.90 | 0.30 | 0.92 |
| | Error | 185 | 3.10 | | |
| 16:1w7 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 40.67 | 283.19 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 89.47 | 623.02 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.84 | 5.88 | <0.001 |
| | Error | 185 | 0.14 | | |
| 18:1w7 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 0.07 | 2.87 | 0.09 |
| | Estado desarrollo | 5 | 24.10 | 964.79 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.06 | 2.37 | <0.05 |
| | Error | 185 | 0.03 | | |
| 18:1w9 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 176.70 | 446.58 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 432.70 | 1093.16 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 1.00 | 2.54 | <0.05 |
| | Error | 185 | 0.40 | | |
| 20:1w9 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 0.01 | 0.71 | 0.40 |
| | Estado desarrollo | 5 | 0.70 | 50.76 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.03 | 2.47 | <0.05 |
| | Error | 185 | 0.01 | | |
| MUFA (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 394.80 | 470.26 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 1045.30 | 1245.04 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 2.70 | 3.21 | <0.01 |
| | Error | 185 | 0.80 | | |

Tabla 5.14. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido de ácidos grasos principales a lo largo del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1ª y 2ª) de *M. brachydactyla*. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P (continuación).

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|--------------------|-------------------|-----|---------|---------|--------|
| 18:2w6 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 5.361 | 425.18 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 14.719 | 1167.46 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.007 | 0.56 | 0.73 |
| | Error | 185 | 0.013 | | |
| 18:3w3 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 0.880 | 134.47 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 2.233 | 341.17 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.004 | 0.68 | 0.64 |
| | Error | 185 | 0.007 | | |
| 20:4w6 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 5.39 | 246.19 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 2.33 | 106.52 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.05 | 2.27 | <0.05 |
| | Error | 185 | 0.02 | | |
| 20:5w3 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 62.50 | 171.56 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 247.51 | 679.37 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 2.41 | 6.61 | <0.001 |
| | Error | 185 | 0.36 | | |
| 22:6w3 (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 39.97 | 208.21 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 207.72 | 1081.93 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.70 | 3.62 | <0.01 |
| | Error | 185 | 0.19 | | |
| PUFA (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 238.40 | 254.83 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 1293.20 | 1382.26 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 4.10 | 4.33 | <0.001 |
| | Error | 185 | 0.90 | | |
| Totales (µg/mg PS) | Puesta | 1 | 3599 | 477.94 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 10826 | 1437.66 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 12 | 1.58 | 0.17 |
| | Error | 185 | 8 | | |
| w3/w6 | Puesta | 1 | 3.94 | 27.62 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 28.94 | 202.85 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.97 | 6.81 | <0.001 |
| | Error | 185 | 0.14 | | |
| 18:1w7/18:1w9 | Puesta | 1 | 0.309 | 494.98 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 0.371 | 593.20 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.004 | 6.07 | <0.001 |
| | Error | 185 | 0.001 | | |
| 20:5w3/22:6w3 | Puesta | 1 | 0.000 | 0.37 | 0.54 |
| | Estado desarrollo | 5 | 0.106 | 88.09 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 0.006 | 5.02 | <0.001 |
| | Error | 185 | 0.001 | | |
| 20:5w3/20:4w6 | Puesta | 1 | 196.33 | 456.27 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 1.86 | 4.33 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 5 | 1.95 | 4.53 | <0.001 |
| | Error | 185 | 0.43 | | |

5.3.6. Composición de ácidos nucleicos

El contenido en ácidos nucleicos presentó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) a lo largo del desarrollo embrionario, observándose como el ADN tuvo dos momentos del desarrollo con un incremento más acusado: del estado II ($0.46 \pm 0.15 \mu\text{g/mg}$ de media) al estado III ($2.0 \pm 0.87 \mu\text{g/mg}$ de media) (Fig. 5.17). En cuanto al contenido en ARN, mostró un incremento alto entre el estado I y el estado II, pasando de valores de $1.24 \pm 0.28 \mu\text{g/mg}$ de media a $2.96 \pm 0.65 \mu\text{g/mg}$ de media. En cuanto a la relación ARN/ADN se apreció un decrecimiento de la relación a medida que avanza el desarrollo hasta el estado V (de 8.45 a 1.21 de media). Entre el estado V y VI se observó un ligero incremento de la relación (de 1.21 a 1.31 de media) (Tablas 5.15 y 5.16).

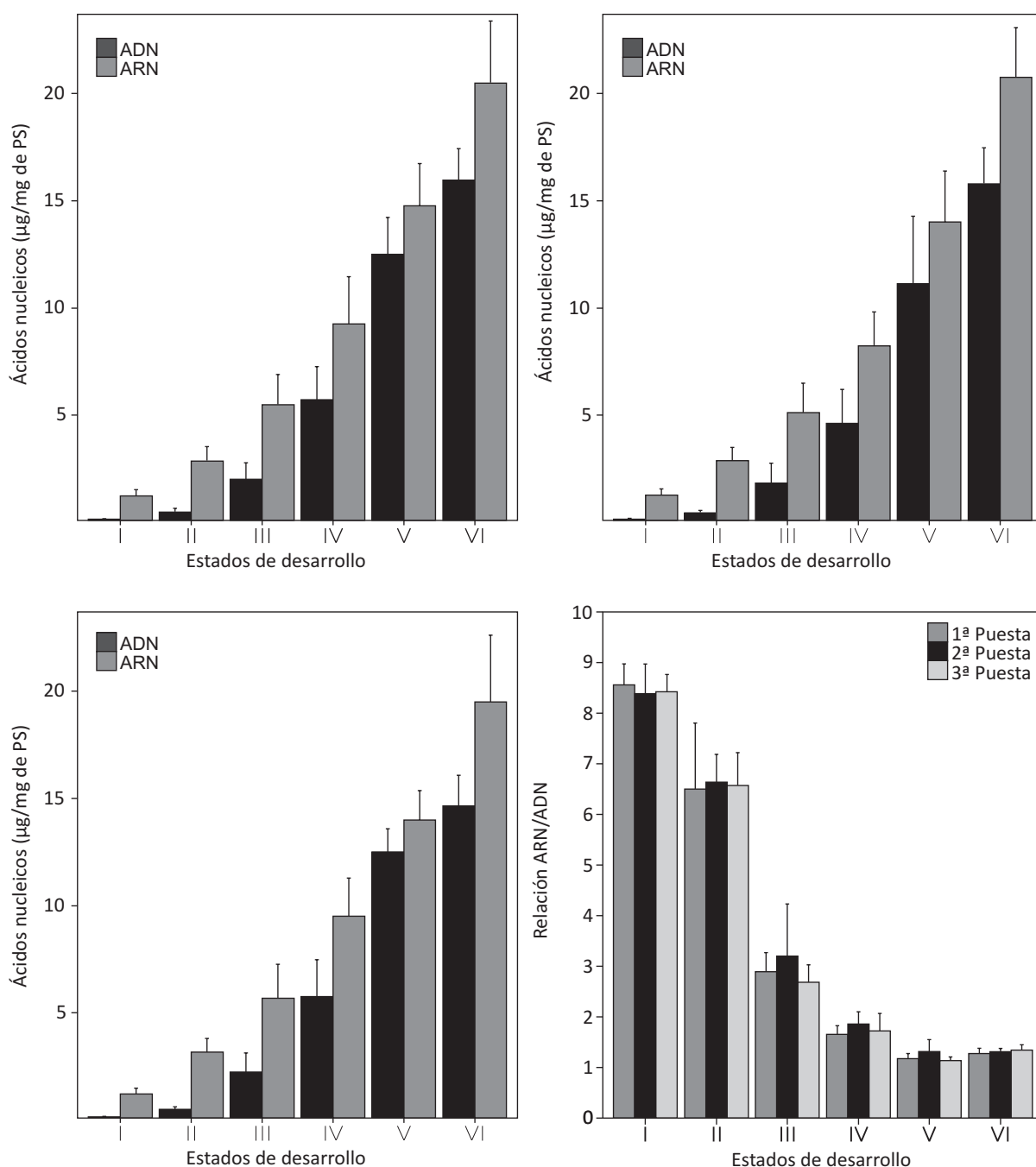


Fig. 5.17. Cambios en el contenido en ácidos nucleicos (ADN, ARN) por mg de tejido ($\mu\text{g/mg}$ PS) a lo largo del desarrollo embrionario de la primera puesta (arriba, izquierda), la segunda puesta (arriba, derecha), la tercera puesta (abajo, izquierda) y de la relación ARN/ADN de cada puesta consecutiva de *M. brachydactyla*.

Para la totalidad del desarrollo, entre las puestas se observaron diferencias significativas en el contenido de ácidos nucleicos y en la relación ARN/ADN (ANOVA, $p < 0.001$) (Tabla 5.16). La primera puesta mostró los valores más elevados del contenido en ADN y ARN; estos valores bajaron en la segunda puesta para volver a subir en la tercera. Por otro lado, la primera puesta mostró los valores más bajos de la relación ARN/ADN con respecto a las otras dos puestas (3.3 ± 2.7).

En la comparación del estado I de desarrollo embrionario en cuatro puestas consecutivas no se observaron diferencias significativas ni en el contenido en ácidos nucleicos ni en la relación ARN/ADN (Tabla 5.17).

Tabla 5.15. Variaciones a lo largo del desarrollo embrionario del contenido en ácidos nucleicos (ADN, ARN) por mg de tejido de la primera puesta (arriba, izquierda), la segunda puesta (arriba, derecha) y la tercera puesta (abajo, izquierda) de *M. brachydactyla*.

| Estado de desarrollo embrionario | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
| | Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado V | Estado VI | % Incremento |
| 1ª Puesta | ADN (μg/mg PS) | 0.14 ± 0.03 ^g | 0.47 ± 0.19 ^{efg} | 2.00 ± 0.78 ^e | 5.72 ± 1.55 ^d | 12.50 ± 1.73 ^c | 15.97 ± 1.46 ^a | 11407.1 |
| | ARN (μg/mg PS) | 1.23 ± 0.28 ^f | 2.86 ± 0.68 ^{ef} | 5.49 ± 1.40 ^d | 9.26 ± 2.21 ^c | 14.77 ± 1.97 ^b | 20.49 ± 2.90 ^a | 1565.8 |
| | ARN/ADN | 8.54 ± 0.46 ^a | 6.49 ± 1.39 ^b | 2.88 ± 0.39 ^c | 1.65 ± 0.19 ^d | 1.19 ± 0.09 ^d | 1.28 ± 0.10 ^d | -85.01 |
| | ADN (% PS) | 0.014 ± 0.003 | 0.05 ± 0.02 | 0.20 ± 0.08 | 0.57 ± 0.15 | 1.25 ± 0.17 | 1.60 ± 0.14 | |
| | ARN (% PS) | 0.12 ± 0.03 | 0.29 ± 0.06 | 0.55 ± 0.14 | 0.93 ± 0.21 | 1.48 ± 0.19 | 2.05 ± 0.28 | |
| 2ª Puesta | ADN (μg/mg PS) | 0.15 ± 0.03 ^g | 0.44 ± 0.12 ^{fg} | 1.83 ± 0.93 ^{ef} | 4.62 ± 1.58 ^d | 11.13 ± 3.15 ^c | 15.79 ± 1.69 ^a | 10526.7 |
| | ARN (μg/mg PS) | 1.28 ± 0.28 ^f | 2.87 ± 0.62 ^f | 5.12 ± 1.38 ^{de} | 8.23 ± 1.60 ^c | 14.01 ± 2.38 ^b | 20.75 ± 2.33 ^a | 1521.1 |
| | ARN/ADN | 8.39 ± 0.61 ^a | 6.62 ± 0.59 ^b | 3.20 ± 1.09 ^c | 1.85 ± 0.25 ^d | 1.31 ± 0.25 ^d | 1.32 ± 0.06 ^d | -84.27 |
| | ADN (% PS) | 0.015 ± 0.003 | 0.04 ± 0.01 | 0.18 ± 0.09 | 0.46 ± 0.15 | 1.11 ± 0.30 | 1.58 ± 0.16 | |
| | ARN (% PS) | 0.13 ± 0.03 | 0.29 ± 0.06 | 0.51 ± 0.14 | 0.82 ± 0.15 | 1.40 ± 0.23 | 2.08 ± 0.22 | |
| 3ª Puesta | ADN (μg/mg PS) | 0.15 ± 0.03 ^g | 0.49 ± 0.13 ^{efg} | 2.23 ± 0.90 ^e | 5.75 ± 1.73 ^d | 12.51 ± 1.08 ^{bc} | 14.65 ± 1.42 ^{ab} | 9766.7 |
| | ARN (μg/mg PS) | 1.22 ± 0.28 ^f | 3.16 ± 0.65 ^{ef} | 5.68 ± 1.58 ^d | 9.52 ± 1.78 ^c | 14.00 ± 1.36 ^b | 19.51 ± 3.10 ^a | 1499.2 |
| | ARN/ADN | 8.42 ± 0.37 ^a | 6.58 ± 0.68 ^b | 2.68 ± 0.35 ^c | 1.74 ± 0.35 ^d | 1.12 ± 0.09 ^d | 1.33 ± 0.13 ^d | -84.20 |
| | ADN (% PS) | 0.014 ± 0.003 | 0.05 ± 0.01 | 0.22 ± 0.09 | 0.58 ± 0.16 | 1.25 ± 0.10 | 1.47 ± 0.13 | |
| | ARN (% PS) | 0.12 ± 0.03 | 0.32 ± 0.06 | 0.57 ± 0.15 | 0.95 ± 0.17 | 1.40 ± 0.13 | 1.95 ± 0.29 | |
| 4ª Puesta | ADN (μg/mg PS) | 0.15 ± 0.02 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | ARN (μg/mg PS) | 1.32 ± 0.17 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | ARN/ADN | 8.57 ± 0.36 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | ADN (% PS) | 0.014 ± 0.003 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | ARN (% PS) | 0.12 ± 0.03 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |

Tabla 5.16. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido de ácidos nucleicos (ADN,ARN) y relación ARN/ADN a lo largo del desarrollo embrionario y entre puestas consecutivas (1ª, 2ª y 3ª) de *M.brachydactyla*. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|------------------|-------------------|-----|---------|---------|--------|
| ADN (µg/mg PS) | Puesta | 2 | 299.30 | 198.11 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 1578.70 | 1045.12 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 2.70 | 1.80 | 0.06 |
| | Error | 254 | 1.50 | | |
| ARN (µg/mg PS) | Puesta | 2 | 401.70 | 159.83 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 2043.80 | 813.18 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 2.10 | 0.84 | 0.59 |
| | Error | 254 | 2.50 | | |
| Relación ARN/ADN | Puesta | 2 | 100.00 | 339.68 | <0.001 |
| | Estado desarrollo | 5 | 442.80 | 1504.21 | <0.001 |
| | Puesta x Estado | 10 | 0.30 | 0.87 | 0.56 |
| | Error | 254 | 0.30 | | |

Tabla 5.17. Resultados de las ANOVAS de una vía evaluando las diferencias en el contenido de ácidos nucleicos (ADN,ARN) y relación ARN/ADN en los huevos en estado I entre puestas consecutivas (1ª, 2ª, 3ª y 4ª) de *M.brachydactyla*. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P |
|------------------|--------|----|--------|------|-------|
| ADN (µg/mg PS) | Puesta | 3 | 0.0005 | 0.48 | 0.696 |
| | Error | 82 | 0.0010 | | |
| ARN (µg/mg PS) | Puesta | 3 | 0.03 | 0.46 | 0.712 |
| | Error | 82 | 0.07 | | |
| Relación ARN/ADN | Puesta | 3 | 0.14 | 0.54 | 0.66 |
| | Error | 82 | 0.25 | | |

5.4. DISCUSIÓN

5.4.1. Estados de desarrollo embrionario

La primera descripción del desarrollo embrionario de *M. brachydactyla* la realizó Lang en 1973. En esta descripción se identificaban nueve estados de desarrollo embrionario, caracterizados por cambios a nivel biométrico (volumen), morfológico (aparición de nauplio, metanauplio, apéndices, ojos) e histológico (diferenciación del ectodermo, del mesodermo, de los órganos, etc). Más tarde, González-Gurriarán *et al.* (1993) realizó otra clasificación basada en los cambios de coloración de los huevos (naranja, marrón o gris-negro) con tres estados de desarrollo embrionario, que resultaba más sencilla para su aplicación en estudios en el medio natural. Posteriormente, Iglesias *et al.* (2002) modificó esta clasificación subdividiendo el estado inicial de desarrollo en dos estados diferenciados por la aparición de la mancha ocular.

Para el estudio de los cambios en la composición bioquímica de los huevos de centolla a lo largo de la embriogénesis, se encontró que las tres clasificaciones presentan ventajas e inconvenientes. La clasificación de Lang proporciona un gran nivel de detalle en las primeras fases del desarrollo, particularmente en sus estados I a III, anteriores a la aparición del nauplio, pero algunos de sus métodos de observación resultan complejos, ya que exigen la realización de estudios histológicos. Por su parte, la clasificación de González-Gurriarán *et al.* (1993) y la de Iglesias *et al.* (2002), resulta sencilla y rápida de

aplicar, pero muestra poco detalle en la primera mitad del desarrollo, que engloba en el primer estado (I). Para el estudio de los cambios a lo largo del desarrollo embrionario desde un enfoque bioquímico, se consideró interesante dividir este período del desarrollo en distintos estados, atendiendo a diferentes procesos como la aparición del nauplio o el metanauplio, con potencial relevancia en la variabilidad de la composición bioquímica. La clasificación detallada de estas primeras fases del desarrollo es importante para entender los cambios que implican interconversión de sustratos ya almacenados dentro del sistema cerrado de desarrollo de los huevos (Subramonian, 1991).

Por todo ello, se vio necesario hacer una nueva clasificación basada en criterios cuantitativos (volumen y diámetro del huevo, índice ocular, porcentaje de desarrollo) y cualitativos (coloración, presencia de ojos y de diversas estructuras, movimientos del embrión) que fueran fáciles de percibir con la simple observación de los huevos bajo una lupa binocular. En el caso de este crustáceo, el considerable tamaño de sus huevos y la transparencia del corión permiten visualizar de forma sencilla rasgos morfológicos característicos de los principales procesos que tienen lugar durante el desarrollo de un embrión. Se buscó elaborar una descripción detallada que pueda ser fácilmente empleada en estudios tanto de campo como de cultivo, sin llegar a convertirse en un proceso laborioso de clasificación.

Entre las novedades introducidas en esta clasificación están la medida del índice ocular, la identificación del color de cada estado mediante un código Pantone® Color Matching System (Pantone Inc., Carlstadt, New Jersey, 07072 USA) que permita su estandarización y la determinación del porcentaje de desarrollo. Las clasificaciones tradicionales suelen presentar la duración de las distintas fases de desarrollo como número de días totales o como días restantes para la eclosión. Sin embargo, la alta variabilidad en la duración del desarrollo en función de la temperatura hace difícil la comparación entre estudios realizados en diferentes condiciones. Por su parte, el porcentaje de desarrollo permite una mejor comparación entre puestas de diferente duración.

La duración del desarrollo embrionario en este estudio (62.5 ± 4.2 días a 13.9°C y 59 ± 3.1 días a 15.3°C) coincidió con lo observado para esta especie en condiciones experimentales por González-Gurriarán *et al.*, (1993) a temperaturas próximas (58 días a 15.9°C). En *M. brachydactyla*, al igual que en otros crustáceos decápodos, la duración del desarrollo embrionario está correlacionada negativamente con la temperatura (Efford, 1969; Wear, 1974; Fukui, 1988; Furota, 1988). Varios estudios sobre esta especie han constatado que su período de incubación de la puesta oscila entre 30 y 77 días, dependiendo de la temperatura del agua (Lang, 1973; Kergariou, 1975, 1984; Brosnan, 1981; Rodhouse, 1984; González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998; García-Flórez & Fernández-Rueda, 2000; Iglesias *et al.*, 2002). Por otra parte, aunque Wear (1974) describió un periodo de diapausa de seis semanas durante el desarrollo embrionario de la centolla a temperaturas de entre 11 y 15 grados, en nuestro estudio no se detectó ningún fenómeno de este tipo.

En *M. brachydactyla*, se observó un cambio progresivo de coloración de los huevos, aproximadamente coincidente con la descrita por González-Gurriarán *et al.* (1993) e Iglesias *et al.*, (2002). Este cambio de coloración fue caracterizado mediante una clave de clasificación del color Pantone® para facilitar su comparación objetiva con futuros estudios, ya que es una clave de color certificada. Las alteraciones de coloración a lo largo del desarrollo son comunes en crustáceos (Mallet *et al.*, 1993; Moriyasu & Lanteigne, 1998; Pinheiro & Hattori, 2002) y generalmente son causadas por la absorción y consumo del vitelo, el desarrollo de los cromatóforos en el abdomen y la aparición y crecimiento de los ojos (p. ej: Krishnan, 1989; Vijayakumar, 1992; Veera Ravi, 1994; Samuel, 2010). Este cambio de coloración ha sido observado de forma similar en otros májidos como *Mithrax caribbaeus* (Fermín, 1991), *Mithrax fórcaps* (Hernández-Reyes *et al.*, 2001) o *Mithrax spinosissimus* (De Sousa *et al.*, 1988) y otros crustáceos decápodos como *Arenaeus cribrarius* (Pinheiro & Hattori, 2002), *Callinectes danae* (Costa & Negreiros-Fransozo, 1996) o *Chionoecetes opilio* (Moriyasu & Lanteigne, 1998).

5.4.2. Características biométricas del huevo a lo largo del desarrollo embrionario

El diámetro medio de los huevos de centolla (0.714 a 0.802 mm) fue mayor al encontrado habitualmente en otros crustáceos decápodos con un rango de diámetros entre 0.280 a 0.450 mm (Anger, 1995). Su incremento (12.1% de media) a lo largo del desarrollo fue similar al observado para esta especie en otras latitudes por Brosnan (1981) (15.5%), Lebour (1927) (12.5%) o Figueiredo & Narciso (2008) (13.2%) y para otros majoideos como *Maja squinado* (10.7%, Durán *et al.*, 2011) o *Microphrys bicornutus* (13.5%, López Greco *et al.*, 2000) y ligeramente inferior al observado en los majoideos *Chionoecetes opilio* (19.9%, Moriyasu & Lanteigne, 1984) y *Stenorhynchus seticornis* (18.7%, Okamori & Cobo, 2003).

El diámetro de los huevos mostró una elevada correlación con el porcentaje de tiempo de desarrollo. Dado que se trata de una medida aplicable a todo el desarrollo embrionario, resulta particularmente interesante como indicadora del grado de desarrollo del embrión. Esta medida del diámetro medio de los huevos junto con la coloración de los huevos, cuyos cambios están relacionados con el consumo de vitelo y el desarrollo del embrión, podría constituir en conjunto un método rápido de determinación del estado aproximado de desarrollo del embrión (porcentaje de desarrollo), lo cual sería muy útil para caracterizar las puestas sin necesidad de realizar observaciones morfológicas más detalladas.

En cuanto al volumen, aunque el incremento (41.6% de media) a lo largo del desarrollo fue superior al de otras latitudes (34.4%, Figueiredo & Narciso, 2008), no alcanzó los valores observados habitualmente en crustáceos decápodos, con incrementos entre un 50% y un 150% de volumen durante el desarrollo (Wear, 1974; Valdés *et al.*, 1991; Petersen & Anger, 1997; Oh & Hartnoll, 1999; Morais *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2008a).

El incremento del tamaño (en términos de diámetro medio y volumen) durante la embriogénesis es una consecuencia de la absorción de agua a través de la membrana celular (Wear 1974; Sibert *et al.*, 2004) y en menor medida, de la retención de agua metabólica como subproducto de la respiración (Pandian, 1970; Amsler & George, 1984; Petersen & Anger, 1997; Rosa *et al.*, 2007). Al igual que en otros braquiuros (Nagao *et al.*, 1999; Gardner, 2001; Pinheiro & Hattori, 2003; Sibert *et al.*, 2004) en el estado final del desarrollo los huevos de centolla presentan un aumento significativo del volumen, consecuencia del aumento de la permeabilidad de la membrana. Esto provoca un incremento en la absorción de agua que facilita la ruptura de la membrana del embrión por medio del incremento de la presión interna en el huevo (DeVries & Forward, 1991; Saigusa, 1992; Glas *et al.*, 1997).

Con respecto a la aparición de la pigmentación ocular (o mancha ocular) en los embriones de *M. brachydactyla*, en este estudio se produjo en el estado IV, transcurrido más del 50% del desarrollo embrionario (56% de desarrollo). Esto coincide con lo observado en otros majoideos como *Chionoecetes bairdi* (Swiney, 2008), *Chionoecetes opilio* (Moriyasu & Lanteigne, 1998), *Hyas araneus* (Petersen, 1995), *Leurocyclus tuberculatus* o *Libinia spinosa* (González-Pisani *et al.*, 2013). Los valores del índice ocular observados en los huevos en desarrollo de *M. brachydactyla* son menores que algunos crustáceos decápodos como *Homarus americanus* (Helluy & Beltz, 1991) o *Paralithodes platypus* (Stevens, 2006, Stevens *et al.*, 2008) y similares o ligeramente superiores a otros crustáceos decápodos como *Cryphiops caementarius* (Reyes-Avalos *et al.*, 2009), *Macrobrachium acanthurus* (Müller *et al.*, 2007) o *Nécora puber* (Valdés *et al.*, 1991).

Se observó una buena correlación entre el índice ocular y el porcentaje de desarrollo de los huevos, lo que podría sugerir que esta medida resulta un buen indicador de desarrollo embrionario para esta especie. Sin embargo, presenta la importante desventaja de la tardía aparición de la mancha ocular (alrededor del 60% de la duración del desarrollo), por lo que su utilidad estaría limitada a las fases finales del desarrollo embrionario.

En la comparación de los huevos recién desovados (estado I) de puestas consecutivas de cultivo con huevos recién desovados (estado I) de diferentes puestas de medio natural se observó que los huevos de cultivo mostraron tamaños similares entre puestas consecutivas, lo que podría indicar a priori una similar inversión maternal por huevo, mientras que los huevos de medio natural presentaron huevos de mayor tamaño en las primeras puestas. Esta similitud de tamaños entre puestas consecutivas de cultivo podría ser consecuencia de la disponibilidad de alimento durante toda la duración de la experiencia de cultivo, ya que las condiciones de temperatura fueron similares a las del medio natural en la primera puesta de invierno (rango: 12.1°C y 15°C; promedio: 13.9 ± 0.55°C) y en las puestas posteriores de primavera y verano (rango: 13.5 °C y 16.9°C; promedio: 15.3 ± 0.92°C).

5.4.3. Composición básica del huevo a lo largo del desarrollo embrionario

En los huevos de *M. brachydactyla* de este estudio el agua contenida oscila entre el 61 y el 80.7%, lo cual es similar a lo observado en los huevos de otros crustáceos decápodos como *Armases cinereum* (Figueiredo *et al.*, 2008a), *Callinectes sapidus* (Amsler & George, 1984); *Chionoecetes opilio* (Reppond *et al.*, 2008), *Hyas araneus* (Petersen & Anger, 1997), *Homarus gammarus* (Rosa *et al.*, 2005). Sin embargo, el incremento del contenido de agua desde el inicio (estado I) al final del desarrollo (estado VI) fue mayor (32%) que lo observado en otros crustáceos decápodos como *Armases cinereum* (Figueiredo *et al.*, 2008a); *Callinectes sapidus* (Amsler & George, 1984); *Nephrops norvegicus* (Rosa *et al.*, 2003); *Uca rapax* (Figueiredo *et al.*, 2008b) y similar al incremento observado en otros majoideos como *Chionoecetes opilio* (Reppond *et al.*, 2008) o *Hyas araneus* (Petersen & Anger, 1997).

Este incremento del agua, que provoca el aumento de volumen durante el desarrollo, conlleva un aumento del peso húmedo y un descenso del peso seco (Pandian, 1970; Clarke *et al.*, 1990; Subramoniam, 1991; Biesiot & Perry, 1995; Lardies & Wehrtmann, 1996; Wehrtmann & Graeve, 1998; Wehrtmann & Kattner, 1998). La materia orgánica desciende en torno a un 70% de su peso seco a lo largo del desarrollo de los huevos de centolla. Además de deberse al incremento de agua, este descenso está también relacionado con el consumo de vitelo para cubrir los requerimientos energéticos del embrión (Pandian, 1970, Siber *et al.*, 2004). En otros majoideos como *Chionoecetes opilio* (Moriyasu & Lanteigne 1998) o *Hyas araneus* (Petersen & Anger, 1997) se han observado elevados consumos de vitelo a lo largo del desarrollo, superiores a lo observado en la mayoría de embriones de crustáceos, donde el consumo del vitelo durante el desarrollo embrionario esta entre un 40% y un 60% (Petersen & Anger, 1997).

El contenido de cenizas en este estudio se incrementa más del doble a lo largo del desarrollo, siendo similar a lo observado en otros majoideos como *Chionoecetes opilio* (Reppond *et al.*, 2008) o *Hyas araneus* (Petersen & Anger, 1997), y mayor que el encontrado en otros crustáceos decápodos como *Nécora púber* (16.2%, Valdés *et al.*, 1991) o *Portunus pelagicus* (23%, Hamid *et al.*, 2015). Este incremento de cenizas puede estar relacionado con la acumulación de microelementos, como el cobre, hierro, zinc o cromo, que son esenciales para la formación de los órganos, el funcionamiento de algunas enzimas e incluso para la biosíntesis de pigmentos respiratorios (Pandian, 1970; Shakuntala, 1976; Babu, 1987; Chatterji *et al.*, 1996; Botton *et al.*, 1998).

Este patrón conjunto de incremento de agua y cenizas y descenso de materia orgánica a lo largo del desarrollo se ha observado en numerosos crustáceos decápodos como *C. sapidus* (Amsler & George, 1984), *H. araneus* (Petersen & Anger, 1997), *H. gammarus* (Pandian, 1970) o *N. púber* (Valdés *et al.*, 1991).

La similitud observada en los huevos recién desovados (estado I) entre puestas consecutivas de cultivo en la composición de materia orgánica y cenizas por mg de tejido, es contraria a lo visto por mg de tejido entre puestas en los huevos recién desovados del medio natural en el cuarto capítulo. Esto podría ser debido a que las diferencias en estas variables están muy relacionadas con las condiciones ambientales. En el medio natural la disponibilidad de alimento para las hembras progenitoras no es óptima ni constante en todo el periodo de desoves mientras que en el cultivo se mantuvo a las hembras alimentadas *ad libitum* durante toda la experiencia.

5.4.4. Composición bioquímica del huevo a lo largo del desarrollo embrionario

El consumo y síntesis de lípidos y proteínas a lo largo del desarrollo embrionario presenta patrones diferenciados entre especies de crustáceos decápodos. Hay especies que emplean los lípidos como fuente principal de energía mientras que las proteínas se mantienen estables o se incrementan ligeramente a lo largo del desarrollo (Pillai & Subramoniam, 1985; Subramoniam, 1991; Yao *et al.*, 2006). Otras consumen tanto lípidos como proteínas durante el desarrollo embrionario (Pandian, 1967; Pandian, 1970; Ponnuchamy *et al.*, 1979; Rao *et al.*, 1981; Amsler & George, 1984; Mathavan *et al.*, 1986; Babu, 1987; Petersen & Anger, 1997; Figueiredo *et al.*, 2008a; Figueiredo *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2012; Soundarapandian *et al.*, 2013a y b). Existe también un tercer patrón más inusual, donde las proteínas son empleadas con principal fuente de energía y los lípidos se mantienen estables (DuPreez & McLachlan, 1984; Clarke *et al.*, 1990; Gardner, 2001).

Los huevos de *M. brachydactyla* siguieron un patrón similar al primero de los descrito, al igual que el majoideo *Chionoecetes opilio* (Reppond *et al.*, 2008), con un importante consumo de lípidos (40%) y un ligero incremento de proteínas (4.5%). Asimismo, este patrón no es común entre majoideos ya que *Hyas araneus*, presenta el segundo de los patrones descritos, con un notable consumo de proteínas (hasta un 35%; Petersen & Anger, 1997)

Al igual que los lípidos, el contenido de carbono por mg de tejido también desciende (13.8%), con una reducción inferior a la del majoideo *Hyas araneus* (35%) y superior a la observada en otras especies de crustáceos decápodos como *Macrobrachium rosenbergii* (Clarke *et al.*, 1990), *Sesarma rectum* y *Sesarma curacaoense* (Anger & Moreira, 2004) y *Lepidophthalmus louisianensis* (Nates & McKenney, 2000).

Entre estados de desarrollo, el mayor incremento de proteínas por mg de tejido en *M. brachydactyla* se produce entre el estado III y IV, momento del desarrollo donde se está produciendo el crecimiento en tamaño del embrión (metanauplio), la segmentación del abdomen y la aparición de la mancha ocular (Lang, 1973). Esto podría estar relacionado con el papel que juegan las proteínas como componentes estructurales de los tejidos y como fuente de energía para los procesos de morfogénesis durante el desarrollo embrionario (Figueiredo *et al.*, 2008b; Samuel & Soundarapandian, 2009; Soundarapandian *et al.*, 2013a). En cambio, los mayores consumos de lípidos y de carbono se observaron en los últimos estados de desarrollo (estado V y VI), lo cual coincide con lo observado para el contenido de carbono en *Hyas araneus* (Petersen & Anger, 1997). Esto podría estar relacionado con una mayor demanda de energía, ya que entre estos estados tienen lugar numerosos procesos, tanto metabólicos como relacionados con la organogénesis: aparece la mancha ocular y se forma el ojo, el funcionamiento de los órganos (ya se observa un latido regular), el movimiento de los apéndices del embrión y el momento de la eclosión (Jun-jie *et al.*, 2006; Soundarapandian *et al.*, 2013b).

Los carbohidratos son el componente minoritario de los huevos de centolla, algo típico en huevos de crustáceos decápodos (Figueiredo & Narciso, 2008; Figueiredo *et al.*, 2008a; Khoei *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Soundarapandian *et al.*, 2013c). Constituyen también una fuente de energía (Biesiot & Perry,

1995; Roustaian & Kamarudin, 2001), aunque a diferencia de los lípidos es de utilización inmediata, y son esenciales para sintetizar componentes específicos como la quitina durante el desarrollo de los crustáceos (Holland, 1978; García-Guerrero *et al.*, 2003a y b; García-Guerrero, 2010). En este estudio, el descenso de carbohidratos fue bastante inferior al encontrado durante el desarrollo embrionario de otros crustáceos decápodos (Amsler & George, 1984; Jun-jie *et al.*, 2006; García-Guerrero & Sandoval, 2012; Habashy *et al.*, 2012; Hamid *et al.*, 2015). La tendencia general es un consumo de carbohidratos a lo largo del desarrollo, sobre todo entre los estados III y V, momento del desarrollo del embrión donde se está produciendo un gran consumo de vitelo para invertir en el crecimiento del embrión (Lang, 1973), y para la síntesis de quitina.

El consumo de los lípidos, el carbono y los carbohidratos por parte del embrión a lo largo de su desarrollo causan un descenso del contenido energético (energía^s y energía^w) por mg de tejido. Este descenso es menor que el observado en otros crustáceos decápodos como *Callinectes sapidus* (Amsler & George, 1984) o *Hyas araneus* (Petersen & Anger, 1997). La mayor pérdida de energía se produce en la segunda mitad del desarrollo (estado IV y VI), y estaría relacionado con la formación de órganos, el comienzo de los movimientos del embrión y del latido del corazón, todos ellos procesos que necesitan de gran gasto energético (Fischer, 2009). Asimismo, en el estado VI el incremento del gasto energético que puede ser atribuido a la demanda adicional de energía requerida para la ruptura del corión durante el proceso de eclosión (Pandian, 1970).

El descenso de la relación C/N a lo largo del desarrollo embrionario, que baja de 4.5 (estado I) a 3.75 (estado VI), refleja un mayor consumo de carbono frente al nitrógeno durante la embriogénesis, ya que el incremento de proteínas (calculadas a partir de nitrógeno) fue pequeño a lo largo del desarrollo. Esto también fue observado para otros crustáceos decápodos como *Hyas araneus* (Petersen & Anger, 1997) o *Macrobrachium rosenbergii* (Clarke *et al.*, 1990). Este descenso de la relación C/N junto con el elevado consumo de lípidos observado podría sugerir que los lípidos constituyen la principal fuente de energía para el desarrollo del embrión de centolla, como se ha visto en otras especies (Holland, 1978; Clarke *et al.*, 1990; Petersen & Anger, 1997; Giménez & Anger, 2001; Roustaian & Kamarudin, 2001; García-Guerrero *et al.*, 2003a y b; Yao *et al.*, 2006; García-Guerrero, 2009).

Comparando el medio natural y el cultivo en los huevos recién desovados (estado I), la tendencia observada entre puestas fue diferente. Las puestas del medio natural mostraron valores más elevados de carbono, lípidos y energía^w por mg de tejido en las puestas posteriores mientras que en el cultivo no se observaron diferencias en estas variables en tres puestas consecutivas. Esto podría estar relacionado con la disponibilidad constante de alimento para las hembras en el cultivo. Por otro lado, en el cultivo los huevos recién desovados de la cuarta puesta presentaron un menor contenido de carbono, de lípidos y de energía^w por mg de tejido. Teniendo en cuenta que la alimentación se mantuvo constante durante el cultivo y las condiciones de temperatura de la segunda y tercera puesta fueron similares a la cuarta, este menor contenido en dichos componentes podría ser consecuencia del desgaste fisiológico de las hembras después de haber llevado a cabo cuatro puestas consecutivas.

5.4.5. Composición de ácidos grasos

5.4.5.1. Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos de los huevos de centolla se mantuvo a lo largo de todo el desarrollo embrionario, al igual que se ha visto en otros crustáceos decápodos (Soundarapandian *et al.*, 2013b). Esto contrasta con el estudio de Figueiredo & Narciso (2008) sobre esta misma especie, donde a lo largo del desarrollo se observó la desaparición del 22:5w6 y la aparición del 16:1w9. Además el perfil de los ácidos grasos se mantuvo constante en las dos puestas sucesivas analizadas.

5.4.5.2. Consumo total de ácidos grasos

En este estudio el descenso del total de ácidos grasos a lo largo del desarrollo fue similar al observado en otras latitudes para esta especie (Figueiredo & Narciso, 2008). Este consumo del total de ácidos grasos a lo largo del desarrollo sugiere que el embrión podría metabolizar estos compuestos para obtener energía para su desarrollo (Wehrtmann & Kattner, 1998). La baja cantidad de ácidos grasos presentes en *M. brachydactyla* antes de la eclosión (estado VI) podría indicar una dependencia de las fuentes externas de alimento (planctotróficas) de la larva recién eclosionada, como se ha visto en otros crustáceos decápodos (Rosa *et al.*, 2007).

De forma general, se observó un primer período (entre los estados I y II) con bajos consumos de ácidos grasos, coincidiendo con la etapa donde se produce la gastrulación, la diferenciación celular y la aparición del nauplio, observándose un bajo consumo de vitelo en general (Lang, 1973). A continuación, se apreció un periodo con un moderado incremento del consumo entre los estados II y III, momento donde aparece el metanauplio y se comienza a producir un incremento del crecimiento del embrión (Lang, 1973). Por último, se detectó un periodo de elevado consumo entre los estados III y VI, coincidiendo con una mayor catabolización del vitelo, lo que libera reservas de nutrientes, entre ellos ácidos grasos, que en las etapas más avanzadas podrían emplearse como fuente de energía para los movimientos del embrión, el funcionamiento de los órganos (p.ej: el latido del corazón) (Lang, 1973) y para cubrir la demanda adicional de energía necesaria para el momento de la eclosión (Pandian, 1970).

La clasificación detallada empleada en el presente estudio permitió observar importantes diferencias dentro de los primeros estados de desarrollo, sobre todo en los estados III y IV donde se observó una reducción considerable (11%) de los ácidos grasos debida a los procesos metabólicos que tienen lugar durante ese periodo, en donde tiene lugar un crecimiento en tamaño del metanauplio o aparece la mancha ocular. Por lo que, la agrupación de los primeros cuatro estados de desarrollo de este estudio en un estado único de desarrollo provocaría una pérdida de información sobre los cambios bioquímicos y energéticos que tienen lugar durante las primeras fases del desarrollo.

5.4.5.3. Composición por grupos de ácidos grasos

Los ácidos grasos insaturados (mono y poliinsaturados) presentaron una tasa de metabolización más alta que los saturados a lo largo del desarrollo embrionario de centolla, y además, se consumieron en mayor proporción. Este patrón de consumo se ha observado en numerosas especies de crustáceos decápodos (Wehrtmann & Graeve, 1998; Wehrtmann & Kattner, 1998; Morais *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2003, 2005, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008a), aunque también se han observado algunos casos con patrones diferentes como *Portunus pelagicus* (Hamid *et al.*, 2015). Sin embargo, entre los tres grupos, los ácidos grasos saturados fueron los que presentaron un mayor consumo, seguidos de los monoinsaturados y en menor proporción los poliinsaturados. A pesar de que Figueiredo & Narciso (2008) emplean una clasificación de estados de desarrollo diferente, fue posible realizar una comparación agrupando los estados I al IV de este estudio para compararlo con el estado I del citado estudio. De este modo, se observó el mismo patrón de consumos para esta especie en Portugal, aunque el consumo de saturados y monoinsaturados fue mayor en el presente estudio.

A lo largo del desarrollo, los saturados comienzan a consumirse en mayor proporción entre el estado II y III, incrementándose su consumo sobre todo entre el III y IV. Por su parte, en los monoinsaturados y los poliinsaturados su mayor consumo se produce en la segunda mitad del desarrollo (entre el estado III y el VI para los monoinsaturados y entre el III y el V para los poliinsaturados). Esto podría indicar que durante el desarrollo, la catabolización de los saturados como fuente de energía comienza anteriormente a la de los ácidos grasos esenciales (mono y poliinsaturados) (Wehrtmann & Graeve, 1998), los cuales podrían quedar retenidos para su empleo posterior, ya que algunos de estos ácidos grasos esenciales tiene un importante papel al final del desarrollo en la mejora de la tasa de eclosión de las larvas (Cavalli *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2002; Jun-jie *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012).

5.4.5.4. Composición de los principales ácidos grasos

En cuanto a los ácidos grasos individuales, se encontró una elevada variabilidad en los patrones y niveles de consumo, asociado probablemente a las variaciones morfológicas que se producen en el embrión durante su desarrollo. El 14.0, el 16.0, el 18:1w9, el 18:2w6 y el 18:3w3 fueron los ácidos grasos que se consumieron en mayor proporción, con consumos superiores al 48% al final del desarrollo. Su mayor consumo se produjo del estado III al V, en el caso del 18:3w3 y el 18:1w9, y desde la mitad del desarrollo hasta la eclosión de la larva (estado III al VI), en el caso del 14.0, el 16.0 y el 18:2w6. En general, este patrón de uso de ácidos grasos es similar al de otros crustáceos decápodos (Clarke *et al.*, 1990; Wehrtmann & Graeve, 1998; Wehrtmann & Kattner, 1998).

En comparación con el estudio de Figueiredo & Narciso (2008) para esta misma especie, los consumos por ácido graso individual alcanzaron valores superiores al 60% en algunos. Entre los más consumidos coincidieron entre ambos estudios el 16.0, el 18:1w9 y el 18:2w6, mientras que en el estudio de Portugal el resto presentaron consumos inferiores (14.0, con un consumo del 33.5%) o no estuvieron presentes en proporciones altas (18:3w3). Además, en el estudio de Portugal apareció el 22:5w3 como uno de los más consumidos, mientras que en este estudio ese ácido graso no fue incluido entre los principales por representar menos del 1% del total de ácidos grasos. Estas diferencias entre medio natural y cultivo podrían estar relacionadas con una diferente composición de la dieta de las hembras progenitoras.

Por lo tanto, aunque los ácidos grasos saturados en conjunto fueron el grupo que tuvo un mayor descenso en el desarrollo de los huevos de *M. brachydactyla*, las tendencias individuales de los ácidos grasos principales reflejaron un consumo combinado de monoinsaturados y saturados. A lo largo del desarrollo, destacó un mayor consumo de los monoinsaturados en el periodo de diferenciación celular (estado I al II) y de formación de los órganos y síntesis de tejidos (estado III al IV); y un mayor consumo de saturados en el momento del paso de nauplio a metanauplio (estado II al III) y en los momentos finales del desarrollo (estado V al VI). Esto podría indicar que los saturados fueron empleados como fuente de energía principal para cubrir el gasto energético de parte del crecimiento del embrión (nauplio a metanauplio), el funcionamiento de los órganos y la musculatura del embrión-prelarva y para la ruptura del corión en el momento de la eclosión. Por su parte, los monoinsaturados, podrían ser empleados preferentemente al inicio de la diferenciación celular, durante la formación de los órganos y tejidos y durante la pigmentación del embrión.

En cuanto a los poliinsaturados, y, más concretamente, los ácidos grasos altamente insaturados, presentaron consumos más bajos a lo largo del desarrollo, lo que podría indicar un posible mantenimiento de estos ácidos grasos esenciales para el momento de la eclosión, en relación con el papel del 20:5w3 y el 22:6w3 en la mejora de la tasa de eclosión de los huevos (Cavalli *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2002; Jun-jie *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012), y para las larvas recién eclosionadas, cuyo contenido en 20:5w3 tiene un efecto positivo sobre su supervivencia (Figueiredo *et al.*, 2012).

Dentro de ellos, el 20:4w6 presentó un consumo ligeramente mayor que el 20:5w3 y el 22:6w3, los cuales se consumieron en similar proporción durante el desarrollo. Los mayores consumos de estos tres ácidos grasos esenciales se produjeron en la segunda mitad del desarrollo, sobre todo entre el estado III y V, momentos en los que se está produciendo la formación de órganos como el corazón y los ojos y/o la síntesis de tejidos que darán lugar a los sistemas nervioso y circulatorio, entre otros. Además, el 22:6w3 se incrementa ligeramente al final del desarrollo embrionario. Todo esto puede estar relacionado con el papel que estos ácidos grasos tienen en el desarrollo de los huevos de crustáceos decápodos (Cahu *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 1999). El 20:4w6 es el precursor de la biosíntesis de las prostaglandinas (Samuel *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2012), las cuales afectan al sistema digestivo, respiratorio y reproductivo y controlan la permeabilidad de iones a través de la membrana y la degradación de los lípidos; mejora el crecimiento larvario y la supervivencia bajo condiciones de estrés (Figueiredo *et al.*, 2012).

Por su parte, el 22:6w3 es considerado uno de los más importantes ácidos grasos en huevos de crustáceos decápodos, suponiendo entre un 10 y un 20% del total de ácidos grasos (Kattner *et al.*, 1994; Wehrtmann & Kattner, 1998), lo cual se observa en los huevos de centolla, donde su contenido inicial es del 16% del total de ácidos grasos. El 22:6w3 juega un papel en la formación del sistema nervioso central de crustáceos y en el crecimiento de las larvas (Bell & Dick, 1990; Fox *et al.*, 1994; Cahu *et al.*, 1995; Samuel *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2012). Además, el 20:5w3 y el 22:6w3 mejoran la tasa de eclosión de los huevos de crustáceos y/o acortan el periodo de desarrollo como se ha observado en otros crustáceos decápodos (p.ej.: Cahu *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2002; Jun-jie *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007a, b; Li *et al.*, 2012), mientras que el 20:5w3 tiene un efecto positivo sobre la supervivencia de las larvas (Figueiredo *et al.*, 2012).

Comparando las puestas recién desovadas (estado I) de cultivo y del medio natural, el perfil de ácidos grasos por mg de tejido fue similar, manteniéndose en ambos casos los principales ácidos grasos, tanto saturados como monoinsaturados y poliinsaturados, incluyendo los ácidos grasos esenciales. Únicamente los ácidos grasos inferiores al 1%, con un total de nueve ácidos grasos, no se encontraron en las muestras de cultivo. Esto podría deberse a las diferencias en la alimentación entre el medio natural y el cultivo. Así, en el cultivo la dieta de las hembras es abundante y esta basada únicamente en mejillón, con lo que el aporte de ácidos grasos a los huevos sería dependiente de la composición de ácidos grasos del mejillón. En cambio, en el medio natural aunque habría mayores oscilaciones en la abundancia y disponibilidad de las presas, la variedad de la dieta sería mayor, lo que aporta una mayor diversidad de ácidos grasos a los tejidos de las hembras.

5.4.6. Composición de ácidos nucleicos

El contenido de ácidos nucleicos por mg de tejido se incrementa a lo largo del desarrollo embrionario de *M. brachydactyla*, siendo mucho mayor el incremento del ADN que el del ARN. Este incremento de los ácidos nucleicos está relacionado con diversos procesos que tienen lugar durante la formación y crecimiento del embrión de *M. brachydactyla* como la diferenciación celular, la organogénesis o el elevado índice de mitosis que se produce en los últimos estados de desarrollo embrionario (Lang, 1973). El mayor incremento de ADN se observa entre los estados II y III, momento donde se está produciendo la diferenciación celular, la aparición de los lóbulos ópticos y de las antenas, el paso de nauplio a metanauplio y el crecimiento en tamaño del embrión. En cambio, en el ARN los mayores incrementos se observan entre el estado I y II, probablemente relacionados con los procesos de división celular y dediferenciación del primordio del embrión que tiene lugar entre estos estados. La relación ARN/ADN desciende a lo largo del desarrollo parece indicar que la mayor actividad de síntesis proteica se produce en los primeros estados.

El patrón de variación del contenido de ácidos nucleicos por mg de tejido entre puestas recién desovadas (estado I) de cultivo fue diferente al del medio natural. El contenido de ácidos nucleicos por mg de tejido en el cultivo presentó valores similares entre puestas sucesivas, mientras que en el medio natural el contenido de ácidos nucleicos fue mayor en las puestas posteriores a la primera puesta en la ría de Arousa. En el cultivo el tamaño de los huevos no difiere entre puestas, lo que podría influir en la inexistencia de variaciones en el ADN y el ARN por mg de tejido entre puestas consecutivas, mientras que en el medio natural las puestas difieren en el tamaño y número de huevos. En este caso, las puestas posteriores están constituidas por un número mayor de huevos que son de menor tamaño que los de las primeras puestas, de modo que por mg de tejido en las puestas posteriores habría un mayor número de huevos y el contenido de ácidos nucleicos se incrementaría con respecto a las primeras puestas.

6

VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN
BIOQUÍMICA A LO LARGO DE LA MADURACIÓN
DE LOS OVARIOS DE *M. BRACHYDACTYLA*
(DECAPODA:MAJIDAE)

6.1. INTRODUCCIÓN

En los braquiuros la madurez sexual incluye una serie de cambios morfológicos y fisiológicos, relacionados con el proceso de maduración gonadal (Oh & Hartnoll, 1999; Leme, 2005; Litulo, 2005; Rasheed & Mustaqim, 2010). Este proceso comienza con la muda pubertal donde los individuos alcanzan la madurez morfológica por medio de la adquisición de los caracteres sexuales secundarios, que comprenden cambios en el tamaño relativo de los quelípedos en los machos y en la morfología y tamaño del abdomen en las hembras en relación con el resto del cuerpo (Teissier, 1933, 1935; Hartnoll, 1963; Pinheiro & Fransozo, 1993; Sampedro *et al.*, 1999; Corgos & Freire, 2006; Rasheed & Mustaqim, 2010). Además, en las hembras también se producen cambios en la forma y estructura de los pleópodos, que aumentan de tamaño para poder albergar a los huevos desovados durante su incubación (Hartnoll, 1968).

En *Maja brachydactyla*, la muda pubertal coincide con la muda terminal, momento que marca el final de la etapa de crecimiento (González Gurriarán *et al.*, 1995; Sampedro *et al.*, 1999). Poco después de esta muda terminal, se produce la migración reproductiva de esta especie hacia aguas más profundas coincidiendo con el comienzo de la maduración de las gónadas y el desarrollo de los receptáculos seminales en las hembras, lo que marca el inicio del ciclo reproductivo. Después del apareamiento las hembras realizan una migración de retorno a aguas someras donde se produce el desove de la primera puesta del ciclo anual de cría. Las hembras incuban los huevos adheridos a los pleópodos durante todo su desarrollo, y simultáneamente se produce una nueva maduración gonadal (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998). Esto permite que tras la eclosión de las larvas se produzca en poco tiempo (3.4 días) un nuevo desove. En Galicia el periodo reproductivo de esta especie abarca principalmente los meses de enero a noviembre, y se estima que una hembra puede llegar a incubar hasta tres puestas anuales (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998).

A lo largo de la maduración se producen cambios estructurales y de la composición bioquímica de los ovarios (Harrison, 1990; Smith *et al.*, 2004), que incluyen modificaciones de las células gonadales, crecimiento de ovocitos, ovulación y oviposición de las hembras (Grassé, 1994). Uno de los procesos importantes que tienen lugar durante el desarrollo de las gónadas es la síntesis de vitelo y su incorporación a los ovocitos, proceso denominado como vitelogénesis. El vitelo es considerado el constituyente estructural de los tejidos en formación y la fuente de nutrientes esencial para el desarrollo del embrión (Krol *et al.*, 1992), ya que está compuesto fundamentalmente de agua, proteínas, que proporcionan el material estructural necesario para la formación de tejidos, y lípidos, que son la principal fuente de energía para los procesos metabólicos que tienen lugar durante la maduración (Adiyodi & Subramoniam, 1983).

En muchos crustáceos decápodos, incluida *M. brachydactyla*, la vitelogénesis sigue un patrón similar con dos fases diferenciadas, la vitelogénesis primaria, caracterizada por una síntesis endógena de vitelo en la que participan estructuras citoplasmáticas como la mitocondria y el complejo de Golgi, y una vitelogénesis secundaria, en la cual nutrientes exógenos (principalmente lipoproteínas) son incorporados por pinocitosis al interior de los ovocitos (Kessel, 1968; Hinsch & Cone, 1969; Eurenus, 1973; Dhainaut & De Leersnyder, 1976; Zerbib, 1979; Aiken & Waddy, 1980; Sokolowicz *et al.*, 2006; Rotllant *et al.*, 2007). Durante este proceso el ovario requiere de una gran cantidad de energía, por lo que los nutrientes particularmente los lípidos son movilizados desde el hepatopáncreas o directamente de la

dieta (Castille & Lawrence, 1989; Harrison, 1990; Millamena & Pascual 1990; Mourente & Rodríguez, 1991; Spaargaren & Haefer, 1994; Cavalli *et al.*, 2001; Rosa & Nunes, 2003a). Esta acumulación de lípidos es crucial para la reproducción (Krol *et al.*, 1992; Cavalli, *et al.*, 2001). Los lípidos además de ser la mayor fuente de energía metabólica y la principal forma de almacén de energía, también sirven para el transporte de nutrientes por la hemolinfa, como precursores de esteroides y de hormonas de la muda y proporcionan ácidos grasos esenciales necesarios para el mantenimiento y la integridad de las membranas celulares (O'Connor & Gilbert, 1968; Middleditch *et al.*, 1980; Harrison, 1990). Además, los aportes de ácidos grasos esenciales a partir de la dieta pueden influir sobre aspectos importantes del ciclo reproductivo como la fecundidad o la tasa de eclosión de los huevos (Xu *et al.*, 1994a; Wen *et al.*, 2002).

Este estudio tiene como objetivo caracterizar los cambios en la composición bioquímica (composición bioquímica básica, composición de fracciones lipídicas y ácidos grasos, y ácidos nucleicos) del ovario de *M. brachydactyla* en relación a los procesos fisiológicos y morfológicos que tienen lugar durante su maduración, lo cual es crucial para un completo entendimiento del ciclo reproductivo en crustáceos (Mourente *et al.*, 1994). También se estudia la existencia de variaciones estacionales en la composición bioquímica del ovario dentro del ciclo de reproductivo anual, para ver la influencia que tienen las condiciones ambientales, tanto a nivel biótico (disponibilidad y calidad del alimento) como abiótico (temperatura) sobre el estado nutricional de las hembras, ya que los nutrientes que son incorporados al ovocito durante su maduración provienen de la dieta (Racotta *et al.*, 2003).

6.2. METODOLOGÍA

6.2.1. Muestreo

En dos zonas geográficas de Galicia, la ría de Arousa y la ría de La Coruña (NW, España), se capturaron hembras de *M. brachydactyla* en dos ciclos anuales de cría (1999 en Arousa y 2003 en Coruña) y dos periodos de desove distintos en cada ciclo. En el primer periodo de desove, que tiene lugar en invierno (diciembre a marzo), las hembras se encuentran realizando la primera puesta, y en el segundo periodo, en primavera-verano (mayo a septiembre), pueden estar desarrollando la segunda o tercera puesta. No se incluyó el mes de abril por ser el mes intermedio entre puestas, donde puede existir solapamiento entre la primera puesta y las puestas posteriores (la información sobre el método de muestreo y la zona de pesca puede ser consultada en el apartado de “Área de Estudio” dentro de “Metodología general”, página 15).

En total se seleccionaron 135 hembras, 65 hembras en el primer periodo de desove y 70 hembras en el segundo periodo de desove en la ría de Arousa y 201 hembras, 85 hembras en el primer periodo de desove y 86 hembras en el segundo periodo de desove y 30 hembras con la madurez morfométrica pero con la gónada todavía inmadura (estado I) en la ría de A Coruña.

6.2.2. Preparación de las muestras

Las hembras fueron trasladadas al laboratorio en neveras portátiles a baja temperatura y con paños humedecidos en agua de mar para mantener un ambiente húmedo. Una vez en el laboratorio, se caracterizó la biometría de los ejemplares siguiendo la metodología descrita en el apartado “Preparación de las Muestras” dentro de “Metodología General” (página 21).

Durante la disección de los ejemplares se determinó el estado de maduración de la gónada siguiendo los criterios macroscópicos de González-Gurriarán *et al.* (1993, 1998). Se extrajo el tejido gonadal y se determinó su peso fresco. A continuación, se recogieron submuestras de tejido gonadal para la caracterización biométrica de los ovocitos y para los análisis bioquímicos del ovario.

Con el peso fresco de la gónada y el peso fresco de cada ejemplar se calculó el índice gonadosomático (IG) empleando la siguiente fórmula:

$$IG = (\text{Peso fresco de la gónada} / \text{Peso total del ejemplar}) * 100$$

La medida de ovocitos en los diferentes estadios de desarrollo se realizó a partir de submuestras fijadas con formol al 4% durante 48 horas y luego conservadas en alcohol 70°. De cada submuestra, se dispusieron entre 40 y 50 ovocitos en una placa de metacrilato dividida en cuatro cuadrantes para facilitar la observación de las muestras. Esas submuestras se examinaron con un estereomicroscopio Nikon SMZ 1500 equipado con un sistema de fotografía DXM-Nikon 1200C, usando luz refleja de una fuente de fibra óptica. Durante estas observaciones se tomaron una serie de fotografías que fueron analizadas con un software de análisis de imagen NIS de Nikon, procediéndose a la medida de la anchura (diámetro mayor, DMAO) y el diámetro medio (DMO) de los ovocitos. Esta caracterización biométrica de los ovocitos permitió verificar la asignación de estados de desarrollo gonadal realizada de forma preliminar durante la evisceración de los ejemplares siguiendo los criterios de González-Gurriarán *et al.* (1993, 1998).

6.2.3. Análisis bioquímicos

Sobre las muestras liofilizadas se realizaron una serie de análisis del contenido en: agua, cenizas, materia orgánica, carbono y nitrógeno (mediante un análisis elemental), lípidos (método de Bligh & Dyer, 1959), fracciones lipídicas (Sukenik *et al.*, 1989), ácidos grasos (Lepage & Roy, 1984), carbohidratos (método de Dubois *et al.*, 1956), ácidos nucleicos (método de Clemmesen, 1993 y Mokness *et al.*, 2000) y energía (energía^s, Salonen *et al.*, 1976 y energía^w, Winberg, 1971). A partir del nitrógeno se estimó el contenido proteico mediante un factor de conversión del nitrógeno (Gnaiger & Bitterlich, 1984). Todos los análisis bioquímicos se realizaron por triplicado, exceptuando los de composición elemental (carbono y nitrógeno) y los de composición de ácidos grasos. En este caso, solo se hicieron réplicas en caso de discrepancias significativas entre muestras. Las técnicas analíticas se detallan en el apartado “Técnicas Analíticas” dentro de “Metodología General” (página 27).

6.2.4. Análisis estadísticos

El análisis de las diferencias de la composición biométrica (diámetro mayor y diámetro medio) y bioquímica del ovario (agua, materia orgánica, cenizas, carbono, relación C/N, lípidos, proteínas, carbohidratos, relación lip/prot, energía^s, energía^w, clases de lípidos, ácidos grasos, ADN, ARN y relación ARN/ADN) entre los estados de desarrollo gonadal (primer apartado de resultados) se testó mediante una ANOVA de una vía, empleando el estado de desarrollo gonadal como variable categórica (con cuatro niveles: estado I (inmaduro), estado II, estado III y estado IV de madurez gonadal), como variable independiente. Para este análisis se emplearon los datos del ciclo de cría de 2003 en la ría de A Coruña. Las diferencias entre niveles de estado de maduración para las variables respuesta que mostraron diferencias significativas se analizan mediante el test a posteriori de Tukey-Kramer.

La relación entre el índice gonadosomático (IG) y las variables biométricas (diámetro mayor y diámetro medio) a lo largo de la maduración gonadal se testó mediante modelos de regresión lineales, realizándose una transformación logarítmica inicial de los datos para obtener un mejor ajuste.

La variabilidad estacional a lo largo del desarrollo gonadal de la composición biométrica y bioquímica de los ovarios (segundo apartado de resultados), se evaluó con una ANOVA de dos vías con interacción entre los factores. La variable respuesta fue cada una de las variables de estudio (diámetro medio, diámetro mayor, agua, materia orgánica, cenizas, carbono, relación C/N, lípidos, proteínas, carbohidratos, relación lip/prot, energía^s, energía^w, clases de lípidos, ácidos grasos, ADN, ARN y relación

ARN/ADN) y los factores fueron el estado de maduración (con tres niveles: estado II, estado III, estado IV) y el periodo de puestas (con dos niveles: primer periodo de desoves y segundo periodo de desoves) ($Y = \text{Periodo de desoves} + \text{Estado de maduración} + \text{Periodo de desoves} : \text{Estado de maduración}$). A continuación, los casos donde las diferencias fueron significativas se evaluaron mediante el test a posteriori de Tukey-Kramer.

El efecto del índice gonadosomático sobre la composición bioquímica (agua, materia orgánica, cenizas, carbono, relación C/N, lípidos, proteínas, carbohidratos, relación lip/prot, energía^s, energía^w, clases de lípidos, ácidos grasos, ADN, ARN y relación ARN/ADN) a lo largo de la maduración gonadal de cada periodo de desove se analizó mediante modelos de regresión. En los modelos de regresión se incluyó una covariable continua y un factor (análisis de la covarianza) (ANCOVA), empleando el IG como covariable y el periodo de desove como factor. Se llevó a cabo una transformación logarítmica de las variables para cumplir las asunciones de normalidad y homocedasticidad. A continuación, se compararon modelos de regresión con la misma pendiente para la relación IG con cada variable ($Y = IG + \text{Periodo de desove}$) frente a modelos de regresión con pendientes diferentes ($Y = IG * \text{Periodo de desove}$) para cada variable de estudio mediante una ANOVA, lo que permitió elegir el modelo de regresión más adecuado para cada caso.

Todos los datos de las variables de estudio fueron presentados como promedio y su desviación estándar o típica (media \pm desviación estándar) a lo largo de la descripción de los resultados de este capítulo.

6.3. RESULTADOS

En este estudio la talla de las hembras no presentó relación significativa con la mayoría de las variables (Anexo, Tabla 1.3). Los escasos casos donde se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$), presentaban una correlación baja (r^2 menor de 0.18), como en el caso de los SFA de la ría de A Coruña en el estado IV de maduración, cuyas diferencias podrían ser debidas a la variabilidad observada dentro del pequeño rango de tallas utilizado (Fig.6.1, Tabla 6.1).

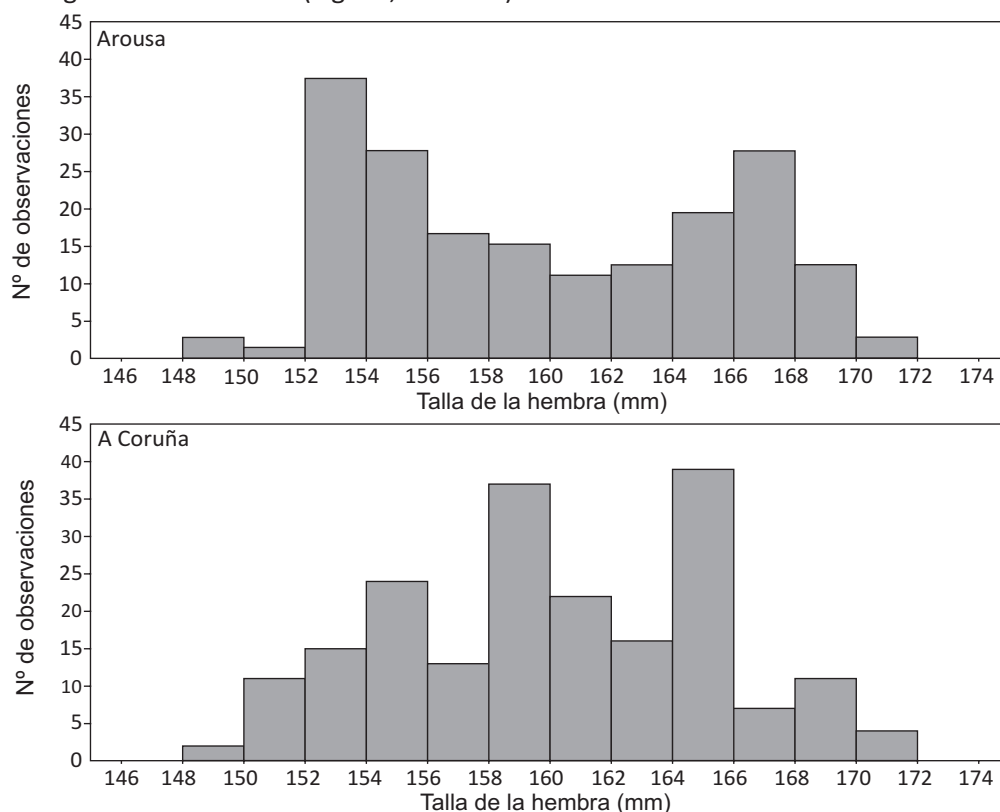


Fig.6.1. Histograma de frecuencias de tallas de las hembras usadas en este estudio en la ría de Arousa (arriba) y en la ría de A Coruña (abajo).

| Estado gonadal | Talla de las hembras (mm) | | | |
|----------------|---------------------------|------------------|-----------------|------------------|
| | Ría de Arousa | | Ría de A Coruña | |
| | N | Media \pm DT | N | Media \pm DT |
| Estado I | | | 30 | 161.7 \pm 6.70 |
| Estado II | 43 | 162.1 \pm 7.78 | 61 | 160.9 \pm 6.44 |
| Estado III | 44 | 158.3 \pm 6.00 | 59 | 161.3 \pm 5.63 |
| Estado IV | 48 | 161.3 \pm 6.53 | 51 | 161.0 \pm 5.40 |

Tabla 6.1. Tallas de las hembras (longitud de cefalotórax, mm) de *M. brachydactyla* de los estados de maduración de la ría de Arousa y de la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar (DE) y el número de hembras (N).

6.3.1. Caracterización de los ovarios a lo largo del desarrollo gonadal

La caracterización de los cambios a lo largo del proceso de madurez del ovario se realizó con muestras procedentes de la ría de A Coruña. En ella, se incluyeron no solo ovarios en diferentes estados de maduración sino también ovarios inmaduros de hembras que acababan de alcanzar la madurez sexual morfométrica. Todas las hembras empleadas en este estudio se encontraban en su primer ciclo de cría.

6.3.1.1. Características biométricas del ovario y de los ovocitos

El peso del ovario (tanto peso húmedo como seco) aumentó significativamente (ANOVA, $p < 0.001$) a lo largo de la madurez, hasta incrementar en 15 veces (en peso húmedo) o 29 veces (en peso seco) su peso inicial (Tabla 6.2). Siguiendo esta misma tendencia, el índice gonadosomático también se incrementó significativamente (ANOVA, $p < 0.001$), alcanzando un valor 15 veces superior al final del desarrollo gonadal (Tabla 6.2). Cabe destacar que el mayor aumento de peso (húmedo y seco) del ovario y del índice gonadosomático se observó entre el estado I (inmaduro) y el estado II (comienzo madurez), donde las tres variables llegaron a triplicar su valor inicial.

En el tamaño de los ovocitos de *M. brachydactyla*, en términos de diámetro mayor o de diámetro medio, se produjo un aumento significativo a lo largo de todo el desarrollo gonadal (ANOVA, $p < 0.001$), pasándose de ovocitos previtelogénicos con un diámetro medio entre 163.3 y 290.8 μm y un diámetro mayor entre 172.0 y 307.9 μm a ovocitos secundarios vitelogénicos o maduros con un diámetro medio entre 686.5 y 718.3 μm y un diámetro mayor entre 734.4 y 828.8 μm . Asimismo, el mayor crecimiento de los ovocitos en tamaño (diámetro mayor y diámetro medio) se apreció al comienzo del desarrollo (estado I a estado II), donde los ovocitos tuvieron un crecimiento en torno al 65% de su tamaño inicial.

Tabla 6.2. Variaciones en las características del ovario (PFG: peso fresco de la gónada, PSG: peso seco de la gónada e IG: índice gonadosomático) y de los ovocitos (DMAO: diámetro mayor y DMO: diámetro medio), junto con su incremento (%) durante el desarrollo gonadal (estados I al IV) de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar y los resultados del estadístico F y del nivel de significancia P de la ANOVA de una vía evaluando las diferencias entre los estados de maduración del ovario. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Parámetros | Estado de desarrollo gonadal | | | | | F | P |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------|--------|-------------|
| | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | | |
| IG (%) | 0.38 \pm 0.13 ^d | 1.15 \pm 0.39 ^c | 2.72 \pm 0.53 ^b | 5.81 \pm 1.22 ^a | 1428.95 | 526.60 | $p < 0.001$ |
| PFG (g) | 4.58 \pm 1.77 ^d | 14.10 \pm 5.26 ^c | 32.85 \pm 6.28 ^b | 70.14 \pm 17.32 ^a | 1431.44 | 401.10 | $p < 0.001$ |
| PSG (g) | 0.96 \pm 0.39 ^d | 3.44 \pm 1.44 ^c | 11.76 \pm 2.84 ^b | 27.98 \pm 7.14 ^a | 2814.58 | 441.70 | $p < 0.001$ |
| DMAO (μm) | 263.79 \pm 35.20 ^d | 434.97 \pm 56.30 ^c | 628.88 \pm 60.32 ^b | 799.20 \pm 25.38 ^a | 202.97 | 949.00 | $p < 0.001$ |
| DMO (μm) | 245.44 \pm 34.24 ^d | 405.98 \pm 53.78 ^c | 588.47 \pm 57.75 ^b | 708.21 \pm 7.37 ^a | 188.55 | 833.90 | $p < 0.001$ |

La relación del índice gonadosomático (IG) con el diámetro medio y con el diámetro mayor de los ovocitos a lo largo del desarrollo del ovario se ajustó mediante un modelo de regresión lineal con logaritmos (Fig. 6.2). El IG mostró una relación positiva significativa (ANOVA, $p < 0.001$) con el diámetro medio ($r^2 = 0.94$) y con el diámetro mayor ($r^2 = 0.95$), apreciándose que el incremento del diámetro mayor con un incremento dado del IG fue ligeramente superior (pendiente de 0.39) que el del diámetro medio (pendiente de 0.38). Asimismo, cabe destacar que en los momentos finales del desarrollo gonadal (estado IV), se observó que el diámetro medio o el diámetro mayor de los ovocitos no siguen incrementándose de tamaño con el aumento del IG, manteniéndose con valores similares en el rango de IG de ovarios a punto de desovar.

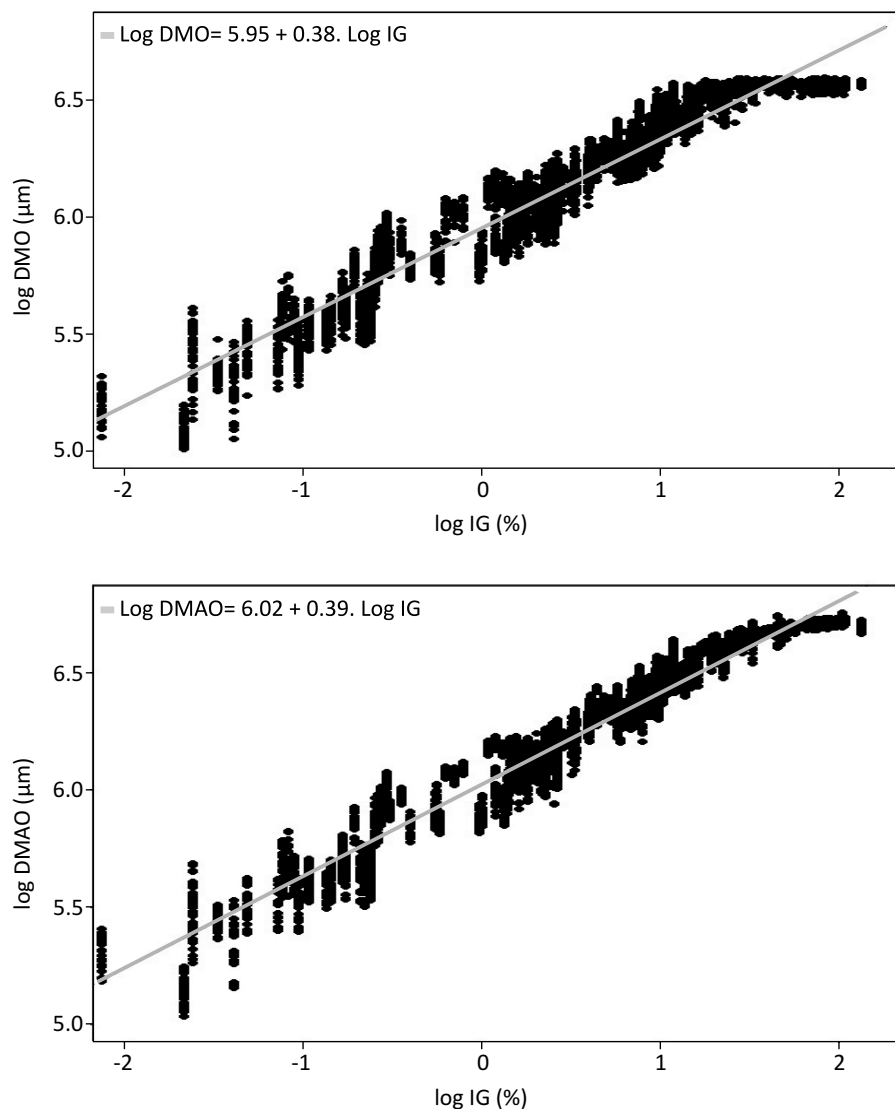


Fig. 6.2. Cambios en el índice gonadosomático en función del diámetro medio (arriba) y el diámetro mayor (abajo) de los ovocitos de *M.brachydactyla*. Se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta.

6.3.1.2. Composición básica del ovario

A lo largo de la maduración gonadal, el contenido en agua, materia orgánica y cenizas del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) mostró diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre estados (Tabla 6.3). Mientras que el contenido en materia orgánica se incrementó más del doble durante la maduración del ovario, el contenido en agua y cenizas mostraron un patrón inverso, disminuyendo su contenido en torno a un 25% al final de la maduración. El mayor incremento de materia orgánica se produjo entre el estado II y el estado III de madurez (70%). Por otra parte, el contenido en agua descendió un 15% entre el estado II y III, y el contenido en cenizas presentó el mayor descenso entre el estado I y II (14%). Además, las cenizas se mantuvieron sin variaciones en la segunda mitad del desarrollo, entre el estado III y el estado IV.

Tabla 6.3. Variaciones en el contenido de agua, materia orgánica (MO) y cenizas por mg de tejido (peso húmedo, PH) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado I al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar y los resultados del estadístico F y del nivel de significancia P de la ANOVA de una vía evaluando las diferencias entre los estados de maduración del ovario. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Parámetros | Estado de desarrollo gonadal | | | | % Incremento | F | P |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------|--------|-------------|
| | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | | | |
| Agua ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) | 792.45 \pm 21.54 ^a | 760.12 \pm 22.48 ^b | 644.96 \pm 26.17 ^c | 601.38 \pm 22.06 ^d | -24.11 | 691.10 | $p < 0.001$ |
| MO ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) | 132.31 \pm 21.96 ^d | 175.42 \pm 31.26 ^c | 298.21 \pm 26.28 ^b | 342.22 \pm 26.01 ^a | 158.65 | 593.50 | $p < 0.001$ |
| Cenizas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) | 75.24 \pm 3.11 ^a | 64.46 \pm 11.04 ^b | 56.84 \pm 10.37 ^c | 56.40 \pm 11.67 ^c | -25.04 | 27.96 | $p < 0.001$ |
| Agua (% PH) | 79.25 \pm 2.15 | 76.01 \pm 2.25 | 64.50 \pm 2.62 | 60.14 \pm 2.21 | | | |
| MO (% PH) | 13.23 \pm 2.20 | 17.54 \pm 3.13 | 29.82 \pm 2.63 | 34.22 \pm 2.60 | | | |
| Cenizas (% PH) | 7.52 \pm 0.31 | 6.45 \pm 1.10 | 5.68 \pm 1.04 | 5.64 \pm 1.17 | | | |

6.3.1.3. Composición bioquímica del ovario

Para el estudio de la composición bioquímica de los huevos recién desovados (estado I) de *M. brachydactyla* entre puestas, años y zonas geográficas se emplearon dos métodos de estimación: uno indirecto, a partir del análisis elemental de carbono y nitrógeno y otro directo, mediante medidas directas de lípidos y carbohidratos. El contenido de nitrógeno se empleó para estimar mediante un factor de conversión (Gnaiger & Bitterlich, 1984) las proteínas. Asimismo, se hizo un cálculo del contenido de energía utilizando dos métodos de estimación indirecta, un método a partir de carbono, energía^s (Salonen *et al.*, 1976) y otro método a partir de lípidos, proteínas y carbohidratos, energía^w (Winberg, 1971).

La composición bioquímica básica del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) presentó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) durante la maduración gonadal de *M. brachydactyla* (Tabla 6.4). Se apreciaron dos patrones contrarios entre variables, el contenido de carbono y de lípidos se incrementó de forma considerable, sobre todo en el caso de los lípidos (20.7% para el carbono y 86% para los lípidos), mientras que el contenido de proteínas descendió ligeramente (2.6%). El mayor incremento de los lípidos (30.2%) se produjo entre el estado II, con valores comprendidos entre un 105.4 y un 165.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS, y el estado III de maduración, con valores entre un 171.0 y un 210.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS. De la misma manera, los mayores incrementos de carbono (8.6%) se observaron en pleno proceso de crecimiento gonadal, pasándose de un contenido de carbono entre un 418.9 y un 459.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS en el estado II a valores entre un 464.4 y un

495.3 µg/mg PS en el estado III. En cambio, en el contenido de proteínas el descenso más alto se observó al comienzo de la maduración (estado I al II), con un 1.2%.

Los carbohidratos mostraron un patrón variable durante la maduración gonadal (Tabla 6.4), incrementándose un 10% al comienzo de la maduración (estado I al II) y luego descendiendo (6.2%) al final del desarrollo gonadal, entre los estados III, con valores entre un 52.2 y un 81.3 µg/mg PS, y el estado IV, con un contenido de carbohidratos entre un 50.5 y un 77.9 µg/mg PS. Cabe destacar que para la totalidad del desarrollo los carbohidratos fueron similares entre los estados intermedios (estado II y III) y entre el estado inicial (estado I) y el estado final (estado IV) del desarrollo gonadal.

En cuanto a las relaciones C/N y lípidos/proteínas, las dos relaciones experimentaron un aumento significativo (ANOVA, $p < 0.001$) durante la maduración, sobre todo entre los estados II y III, donde se incrementó un 9.2% la relación C/N y un 30.4% la relación lípidos/proteínas (Tabla 6.4).

El contenido de energía^s y energía^w fue aumentando de forma significativa a lo largo de la maduración gonadal (ANOVA, $p < 0.001$), alcanzando valores máximos de 23.5 J/mg PS (energía^s) y 25.7 J/mg PS (energía^w) en el estado IV (Tabla 6.4). El aumento más acusado se apreció entre el estado II y III, con un incremento del 8.6% (energía^s) y de un 7.2% (energía^w) en el ovario.

Tabla 6.4. Variaciones en el contenido de carbono (C), lípidos (Lip), proteínas (Prot), carbohidratos (Carbo), relación C/N, relación lípidos/proteínas (Lip/Prot), energía^s y energía^w por mg de tejido (peso seco, PS) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado I al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar y los resultados del estadístico F y del nivel de significancia P de la ANOVA de una vía evaluando las diferencias entre los estados de maduración del ovario. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Estado de desarrollo gonadal | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------|--------|-------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | F | P |
| C (µg/mg PS) | 411.41 \pm 12.13 ^d | 442.78 \pm 11.65 ^c | 480.92 \pm 7.00 ^b | 496.53 \pm 7.61 ^a | 20.69 | 655.30 | $p < 0.001$ |
| Lip (µg/mg PS) | 120.29 \pm 26.48 ^d | 145.40 \pm 15.60 ^c | 189.25 \pm 11.70 ^b | 223.64 \pm 7.71 ^a | 85.92 | 395.00 | $p < 0.001$ |
| Prot (µg/mg PS) | 646.60 \pm 9.93 ^a | 639.08 \pm 4.46 ^b | 634.45 \pm 5.40 ^c | 629.68 \pm 4.60 ^d | -2.62 | 58.78 | $p < 0.001$ |
| Carbo (µg/mg PS) | 64.35 \pm 9.12 ^b | 70.81 \pm 8.65 ^a | 68.90 \pm 7.70 ^a | 64.64 \pm 7.39 ^b | 0.45 | 7.49 | $p < 0.001$ |
| Relación C/N | 3.68 \pm 0.13 ^d | 4.01 \pm 0.11 ^c | 4.38 \pm 0.07 ^b | 4.56 \pm 0.08 ^a | 23.91 | 715.00 | $p < 0.001$ |
| Relación Lip/Prot | 0.19 \pm 0.04 ^d | 0.23 \pm 0.02 ^c | 0.30 \pm 0.02 ^b | 0.36 \pm 0.01 ^a | 89.47 | 438.40 | $p < 0.001$ |
| Energía ^s (J/mg PS) | 18.93 \pm 0.56 ^d | 20.37 \pm 0.54 ^c | 22.12 \pm 0.32 ^b | 22.84 \pm 0.35 ^a | 20.66 | 655.10 | $p < 0.001$ |
| Energía ^w (J/mg PS) | 21.15 \pm 1.14 ^d | 22.07 \pm 0.67 ^c | 23.66 \pm 0.51 ^b | 24.84 \pm 0.34 ^a | 17.45 | 269.20 | $p < 0.001$ |
| C (% PS) | 41.14 \pm 1.21 | 44.28 \pm 1.16 | 48.09 \pm 0.70 | 49.65 \pm 0.76 | | | |
| Líp (% PS) | 12.03 \pm 2.65 | 14.54 \pm 1.56 | 18.92 \pm 1.17 | 22.36 \pm 0.77 | | | |
| Prot (% PS) | 64.66 \pm 0.99 | 63.91 \pm 0.45 | 63.45 \pm 0.54 | 62.97 \pm 0.46 | | | |
| Carbo (% PS) | 6.43 \pm 0.91 | 7.08 \pm 0.87 | 6.89 \pm 0.77 | 6.46 \pm 0.74 | | | |

6.3.1.4. Composición de clases de lípidos

Las tres clases lipídicas del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) mostraron incrementos significativos a lo largo de la maduración gonadal (ANOVA, $p < 0.001$) (Tabla 6.5). En los lípidos neutros el mayor aumento (48.4%) se produjo al comienzo de la maduración, entre el estado I, con valores entre un 20.7 y un 38.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS, y el estado II, con un contenido en neutrolípidos comprendido entre un 30.7 y un 57.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS. En los fosfolípidos, que se mantuvieron sin cambios al comienzo del desarrollo (estado I y II), el mayor incremento (27.9%) se observó entre el estado II, con valores entre un 54.8 y un 98.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS, y el estado III, con un rango entre un 91.7 y un 132.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS de fosfolípidos. En cuanto a los glucolípidos, las subidas más elevadas (75.4%) se produjeron en la primera parte de la maduración, desde el estado I con un contenido mínimo de glucolípidos de 10.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS, hasta el estado III, con un valor máximo de glucolípidos de 34.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS. Cabe destacar que en porcentajes los fosfolípidos no sigue la misma tendencia de incrementos vista para las otras dos clases de lípidos tanto por mg de tejido como por porcentaje (Tabla 6.5). En los fosfolípidos, la proporción disminuyó durante el desarrollo gonadal, sobre todo al comienzo (estado I al II), con un descenso del 9%, y al final de la maduración gonadal (estado II al IV), con una disminución del 8.8%.

Tabla 6.5. Variaciones en el contenido en neutrolípidos (NL), glucolípidos (GL), fosfolípidos (FL) por mg de tejido (peso seco, PS) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado I al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar y los resultados del estadístico F y del nivel de significancia P de la ANOVA de una vía evaluando las diferencias entre los estados de maduración del ovario. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Estado de desarrollo gonadal | | | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------|--------|-------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | F | P |
| NL ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 29.30 \pm 4.50 ^d | 43.49 \pm 5.62 ^c | 57.94 \pm 5.09 ^b | 81.01 \pm 5.21 ^a | 176.48 | 772.70 | $p < 0.001$ |
| GL ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 14.24 \pm 3.46 ^d | 18.79 \pm 3.73 ^c | 24.98 \pm 4.36 ^b | 28.03 \pm 3.37 ^a | 96.84 | 110.50 | $p < 0.001$ |
| FL ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 76.74 \pm 21.08 ^c | 83.12 \pm 10.08 ^c | 106.33 \pm 8.15 ^b | 114.60 \pm 7.55 ^a | 49.34 | 115.10 | $p < 0.001$ |
| NL (% Lípidos) | 24.99 \pm 3.58 | 29.96 \pm 2.80 | 30.61 \pm 1.85 | 36.22 \pm 1.81 | | | |
| GL (% Lípidos) | 12.16 \pm 2.78 | 12.88 \pm 1.90 | 13.20 \pm 2.16 | 12.54 \pm 1.51 | | | |
| FL (% Lípidos) | 62.85 \pm 5.19 | 57.16 \pm 3.38 | 56.19 \pm 2.54 | 51.24 \pm 2.85 | | | |

6.3.1.5. Composición de ácidos grasos

6.3.1.5.1. Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos de los ovarios de *M. brachydactyla* presentó un total de 40 ácidos grasos pertenecientes a cuatro grupos: ácidos grasos saturados (SFA; 11 ácidos grasos), ácidos grasos ramificados (BFA; 4 ácidos grasos), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA; 13 ácidos grasos) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA; 12 ácidos grasos) (Tabla 6.6). Se observó que el perfil de ácidos grasos en el estado I presentó un menor número de ácidos grasos que el resto de estados, con un total de 34 ácidos grasos.

El grupo de ácidos grasos observado en mayor proporción fueron los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), con valores medios comprendidos entre el 65.1 \pm 1.62% (estado I) y el 43.9 \pm 1.26% (estado IV) (Tabla 6.6). En este grupo cabe destacar la elevada proporción del 20:5w3 (30.9 \pm 1.10% en estado I y 21.5 \pm 0.83% en estado IV) y del 22:6w3 (22.6 \pm 0.65% en estado I y 15.4 \pm 0.84% en estado IV). El siguiente

grupo por orden de importancia fue el de los monoinsaturados (MUFA), cuyo porcentaje medio fue de $29.22 \pm 0.78\%$ en el estado IV, dentro del cual destacó por su mayor proporción el 18:1w9, con valores medios de $12.5 \pm 0.57\%$ en el estado IV de desarrollo. A continuación, los ácidos grasos saturados (SFA), con un porcentaje ligeramente inferior a los monoinsaturados, oscilaron entre el $10.6 \pm 1.23\%$ (estado I) y el $25.1 \pm 1.69\%$ (estado IV). En este grupo el ácido graso sobresaliente fue el 16:0, con una proporción media entre el $6.7 \pm 1.12\%$ (estado I) y el $16.0 \pm 1.50\%$ (estado IV). El último grupo, con un porcentaje mucho menor, los ácidos grasos ramificados (BFA), los cuales mostraron un rango de proporciones entre un $3.7 \pm 0.19\%$ en el estado I y un $1.8 \pm 0.16\%$ en el estado IV.

Tabla 6.6. Variaciones en la proporción (% del total de ácidos grasos) de los ácidos grasos individuales y de los sumatorios por grupos de ácidos grasos saturados (SFA), ramificados (BFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) a lo largo del desarrollo gonadal de *Maja brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar.

| Estado de desarrollo gonadal | | | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV |
| 12:0 (%) | 0.07 ± 0.03 | 0.20 ± 0.08 | 0.19 ± 0.06 | 0.19 ± 0.04 |
| 13:0 (%) | 0.01 ± 0.01 | 0.04 ± 0.02 | 0.04 ± 0.02 | 0.04 ± 0.02 |
| 14:0 (%) | 0.72 ± 0.17 | 2.37 ± 0.30 | 2.88 ± 0.33 | 3.11 ± 0.36 |
| 15:0 (%) | 0.30 ± 0.09 | 0.61 ± 0.10 | 1.01 ± 0.09 | 1.03 ± 0.05 |
| 16:0 (%) | 6.72 ± 1.12 | 15.25 ± 0.82 | 15.69 ± 1.14 | 15.99 ± 1.50 |
| 18:0 (%) | 2.76 ± 0.31 | 4.18 ± 0.45 | 4.23 ± 0.50 | 4.43 ± 0.42 |
| 20:0 (%) | 0.02 ± 0.02 | 0.08 ± 0.02 | 0.11 ± 0.03 | 0.11 ± 0.02 |
| 21:0 (%) | 0.00 ± 0.00 | 0.04 ± 0.01 | 0.05 ± 0.02 | 0.09 ± 0.02 |
| 22:0 (%) | 0.00 ± 0.00 | 0.08 ± 0.05 | 0.09 ± 0.02 | 0.12 ± 0.02 |
| 23:0 (%) | 0.00 ± 0.00 | 0.01 ± 0.01 | 0.03 ± 0.02 | 0.04 ± 0.05 |
| 24:0 (%) | 0.00 ± 0.00 | 0.01 ± 0.02 | 0.01 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 |
| ΣSFA (%) | 10.60 ± 1.23 | 22.87 ± 1.08 | 24.32 ± 1.21 | 25.15 ± 1.69 |
| Iso 15:0 (%) | 0.79 ± 0.08 | 0.23 ± 0.02 | 0.35 ± 0.03 | 0.29 ± 0.04 |
| Anteiso 15:0 (%) | 0.91 ± 0.09 | 0.88 ± 0.16 | 0.63 ± 0.05 | 0.50 ± 0.04 |
| Iso 16:0 (%) | 1.15 ± 0.17 | 0.43 ± 0.22 | 0.75 ± 0.13 | 0.54 ± 0.07 |
| Anteiso 16:0 (%) | 0.89 ± 0.09 | 0.30 ± 0.07 | 0.45 ± 0.03 | 0.43 ± 0.03 |
| ΣBFA (%) | 3.74 ± 0.19 | 1.84 ± 0.45 | 2.18 ± 0.23 | 1.76 ± 0.16 |
| 14:1w5 (%) | 0.00 ± 0.00 | 0.07 ± 0.05 | 0.08 ± 0.05 | 0.09 ± 0.05 |
| 16:1w7 (%) | 3.64 ± 0.63 | 5.51 ± 1.01 | 7.00 ± 1.14 | 7.55 ± 0.62 |
| 16:1w5 (%) | 0.43 ± 0.04 | 0.14 ± 0.04 | 0.22 ± 0.02 | 0.23 ± 0.06 |
| 17:1w8 (%) | 0.38 ± 0.12 | 0.28 ± 0.05 | 0.29 ± 0.04 | 0.29 ± 0.04 |
| 18:1w13 (%) | 1.36 ± 0.14 | 0.49 ± 0.12 | 0.60 ± 0.09 | 0.64 ± 0.08 |
| 18:1w9 (%) | 7.42 ± 1.00 | 1.33 ± 0.26 | 10.6 ± 0.70 | 2.51 ± 0.57 |
| 18:1w7 (%) | 3.39 ± 0.23 | 4.00 ± 0.53 | 4.92 ± 0.35 | 5.47 ± 0.29 |
| 20:1w15 (%) | 0.79 ± 0.08 | 0.20 ± 0.02 | 0.19 ± 0.06 | 0.42 ± 0.09 |
| 20:1w14 (%) | 2.72 ± 0.28 | 0.50 ± 0.05 | 0.90 ± 0.06 | 0.83 ± 0.09 |
| 20:1w9 (%) | 0.10 ± 0.04 | 0.76 ± 0.05 | 0.87 ± 0.15 | 0.83 ± 0.14 |
| 22:1w9 (%) | 0.09 ± 0.04 | 0.18 ± 0.08 | 0.17 ± 0.04 | 0.18 ± 0.02 |
| 23:1w9 (%) | 0.25 ± 0.03 | 0.23 ± 0.12 | 0.14 ± 0.03 | 0.13 ± 0.03 |
| 24:1w9 (%) | 0.00 ± 0.00 | 0.07 ± 0.07 | 0.04 ± 0.05 | 0.04 ± 0.05 |
| ΣMUFA (%) | 20.56 ± 1.24 | 23.75 ± 0.99 | 26.04 ± 0.58 | 29.22 ± 0.78 |
| 18:2w6 (%) | 1.25 ± 0.20 | 1.17 ± 0.20 | 1.13 ± 0.15 | 1.14 ± 0.11 |
| 18:3w6 (%) | 3.69 ± 0.36 | 1.36 ± 0.16 | 0.73 ± 0.07 | 0.56 ± 0.05 |
| 18:3w3 (%) | 0.06 ± 0.03 | 0.13 ± 0.05 | 0.17 ± 0.02 | 0.15 ± 0.02 |
| 20:3w6 (%) | 0.02 ± 0.02 | 0.04 ± 0.03 | 0.09 ± 0.02 | 0.10 ± 0.02 |
| 20:4w6 (%) | 2.17 ± 0.34 | 3.56 ± 0.56 | 3.43 ± 0.39 | 3.10 ± 0.38 |
| 20:2w9,15 (%) | 2.14 ± 0.22 | 0.30 ± 0.04 | 0.35 ± 0.13 | 0.64 ± 0.26 |
| 20:2w6,15 (%) | 0.66 ± 0.07 | 0.16 ± 0.03 | 0.19 ± 0.01 | 0.27 ± 0.02 |
| 20:2w6 (%) | 0.30 ± 0.06 | 0.30 ± 0.03 | 0.29 ± 0.03 | 0.34 ± 0.02 |
| 20:4w3 (%) | 0.17 ± 0.02 | 0.15 ± 0.04 | 0.13 ± 0.06 | 0.14 ± 0.07 |
| 20:5w3 (%) | 30.87 ± 1.10 | 25.52 ± 1.66 | 23.03 ± 0.81 | 21.51 ± 0.83 |
| 22:5w3 (%) | 1.12 ± 0.12 | 0.59 ± 0.16 | 0.59 ± 0.04 | 0.51 ± 0.05 |
| 22:6w3 (%) | 22.64 ± 0.65 | 18.26 ± 0.74 | 17.33 ± 0.48 | 5.42 ± 0.84 |
| Σ PUFA (%) | 65.10 ± 1.62 | 51.54 ± 1.61 | 47.45 ± 1.26 | 3.87 ± 1.26 |

6.3.1.5.2. Composición por grupos de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos totales del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) se incrementó significativamente a lo largo de la maduración (ANOVA, $p < 0.001$), observándose el incremento más acusado (61.4%) entre el estado I, con un contenido entre un 47.8 y un 67.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS, y el estado II, con valores comprendidos entre un 77.6 y un 106.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS, del desarrollo gonadal (Tabla 6.7).

En el análisis de la composición de ácidos grasos del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) por grupos se apreció que los ácidos grasos poliinsaturados presentaron los mayores valores (37.1 ± 3.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) al comienzo del desarrollo, seguidos por los monoinsaturados (11.8 ± 1.78 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS), los saturados (6.1 ± 1.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) y en mucha menor cantidad los ramificados (2.1 ± 0.15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) (Tabla 6.7). Los poliinsaturados se mantuvieron como el grupo predominante durante todo el desarrollo.

Los tres grupos principales (SFA, MUFA y PUFA) mostraron diferencias significativas, con un incremento considerable, a lo largo del desarrollo gonadal (ANOVA, $p < 0.001$) (Tabla 6.7). Entre grupos de ácidos grasos, el contenido de ácidos grasos saturados por mg de tejido incrementó en mayor cantidad, con valores al final de la maduración de más de cinco veces su valor inicial, mientras que los monoinsaturados por mg de tejido llegaron a triplicar su contenido inicial y los poliinsaturados, que fueron los que se incrementaron en menor cantidad, presentaron un contenido al final del desarrollo de casi el doble de su valor inicial. Los mayores incrementos se observaron al comienzo de la maduración con aumentos del 245.5% para SFA, 85.9% para MUFA y 28.0% para PUFA entre el estado I y II de desarrollo. Con respecto a los porcentajes, los PUFA no siguen la misma tendencia observada en los SFA y MUFA, los cuales se incrementan durante la maduración. En el caso de los PUFA la proporción desciende, sobre todo al comienzo del desarrollo (estado I al II), con una disminución del 20.8% (Tabla 6.7).

6.3.1.5.3. Composición de los ácidos grasos principales

Para analizar las variaciones del contenido de ácidos grasos individuales a lo largo de la maduración de los ovarios, se seleccionaron los principales ácidos grasos presentes en el ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS). Para ello, el criterio empleado fue la proporción frente al total de ácidos grasos, tomándose solamente aquellos que se encontraban en una proporción superior al 1% en alguno de los estados de maduración del ovario (estado II, III o IV) (Tabla 6.6). Por lo tanto, los ácidos grasos ISO 16:0, 18:1w13, 20:1w14, 20:2w9, 15 y 22:5w3, que solamente aparecieron en una proporción superior al 1% en el estado I (ovario inmaduro), no fueron seleccionados (Tabla 6.6). Los ácidos grasos seleccionados fueron: 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0 en el grupo de saturados, 16:1w7, 18:1w7, 18:1w9 en el grupo de los monoinsaturados y 18:2w6, 18:3w6, 20:4w6, 20:5w3, 22:6w3 en el grupo de los poliinsaturados.

Los ácidos grasos individuales del grupo de los saturados, aumentaron significativamente durante la maduración del ovario (ANOVA, $p < 0.001$), observándose que los mayores incrementos se produjeron al comienzo de la maduración, entre el estado I y II, con un incremento desde 142.8% para el 18:0 hasta el 431.7% para el 14:0 (Tabla 6.7). La misma tendencia se observó en los ácidos grasos individuales del grupo de los monoinsaturados, con incrementos significativos a lo largo del desarrollo del ovario (ANOVA, $p < 0.001$), desde 91.2% para el 18:1w7 hasta el 143.6% para el 18:1w9 (Tabla 6.7). El mayor incremento, al igual que en los saturados, se apreció entre el estado I, con valores comprendidos entre un 1.1 y un 3.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 16:1w7, entre un 1.5 y un 2.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 18:1w7 y entre un 2.4 y un 5.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 18:1w9, y el estado II, con un rango entre un 2.3 y un 7.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 16:1w7, entre un 2.3 y un 4.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 18:1w7 y entre un 9.0 y un 11.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el 18:1w9.

Tabla 6.7. Variaciones en el contenido de los principales ácidos grasos del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) junto con su incremento (%) desde el estado I al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar y los resultados del estadístico F y del nivel de significancia P de la ANOVA de una vía evaluando las diferencias entre los estados de maduración del ovario. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Estado de desarrollo gonadal | | | | | | | |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------|---------|-------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | F | P |
| 14.0 | 0.41 \pm 0.09 ^d | 2.18 \pm 0.30 ^c | 3.48 \pm 0.43 ^b | 4.37 \pm 0.70 ^a | 965.85 | 561.00 | $p < 0.001$ |
| 15.0 | 0.17 \pm 0.04 ^d | 0.56 \pm 0.12 ^c | 1.23 \pm 0.17 ^b | 1.44 \pm 0.14 ^a | 747.06 | 814.00 | $p < 0.001$ |
| 16.0 | 3.88 \pm 0.94 ^d | 14.05 \pm 1.13 ^c | 18.99 \pm 1.81 ^b | 22.33 \pm 1.80 ^a | 475.52 | 1041.00 | $p < 0.001$ |
| 18.0 | 1.59 \pm 0.33 ^d | 3.86 \pm 0.56 ^c | 5.12 \pm 0.72 ^b | 6.20 \pm 0.64 ^a | 289.94 | 405.90 | $p < 0.001$ |
| Σ SFA | 6.10 \pm 1.22 ^d | 21.08 \pm 1.74 ^c | 29.45 \pm 2.42 ^b | 35.17 \pm 2.51 ^a | 476.56 | 1349.00 | $p < 0.001$ |
| 16:1w7 | 2.11 \pm 0.55 ^d | 5.12 \pm 1.16 ^c | 8.48 \pm 1.52 ^b | 10.58 \pm 1.05 ^a | 401.42 | 403.60 | $p < 0.001$ |
| 18:1w7 | 1.94 \pm 0.26 ^d | 3.71 \pm 0.70 ^c | 5.97 \pm 0.66 ^b | 7.68 \pm 0.76 ^a | 295.88 | 617.60 | $p < 0.001$ |
| 18:1w9 | 4.29 \pm 0.95 ^d | 10.45 \pm 0.80 ^c | 12.84 \pm 1.29 ^b | 17.55 \pm 1.60 ^a | 309.09 | 805.40 | $p < 0.001$ |
| Σ MUFA | 11.81 \pm 1.78 ^d | 21.96 \pm 2.50 ^c | 31.55 \pm 2.54 ^b | 40.97 \pm 3.42 ^a | 246.91 | 892.41 | $p < 0.001$ |
| 18:2w6 | 0.73 \pm 0.19 ^d | 1.09 \pm 0.25 ^c | 1.38 \pm 0.26 ^b | 1.60 \pm 0.26 ^a | 119.18 | 95.60 | $p < 0.001$ |
| 18:3w6 | 2.09 \pm 0.18 ^a | 1.25 \pm 0.16 ^b | 0.88 \pm 0.09 ^c | 0.79 \pm 0.05 ^d | -62.20 | 825.89 | $p < 0.001$ |
| 20:4w6 | 1.25 \pm 0.30 ^c | 3.30 \pm 0.68 ^b | 4.14 \pm 0.49 ^a | 4.35 \pm 0.71 ^a | 248.00 | 204.20 | $p < 0.001$ |
| 20:5w3 | 17.60 \pm 1.37 ^d | 23.49 \pm 1.67 ^c | 27.84 \pm 1.55 ^b | 30.12 \pm 1.98 ^a | 71.14 | 416.60 | $p < 0.001$ |
| 22:6w3 | 12.93 \pm 1.26 ^c | 16.88 \pm 1.77 ^b | 21.00 \pm 1.76 ^a | 21.66 \pm 2.39 ^a | 67.52 | 184.30 | $p < 0.001$ |
| Σ PUFA | 37.14 \pm 3.08 ^d | 47.53 \pm 3.79 ^c | 57.43 \pm 3.81 ^b | 61.51 \pm 4.93 ^a | 65.62 | 290.97 | $p < 0.001$ |
| Σ TOTALES | 57.17 \pm 5.98 ^d | 92.26 \pm 7.29 ^c | 121.06 \pm 7.89 ^b | 140.11 \pm 9.25 ^a | 145.08 | 841.45 | $p < 0.001$ |

En los poliinsaturados también se observaron diferencias significativas, aunque con dos patrones diferenciados a lo largo del desarrollo gonadal (ANOVA, $p < 0.001$) (Tabla 6.7). Así, el contenido en el 18:3w6 descendió significativamente ($p < 0.001$), mientras que el contenido de 18:2w6, 20:4w6, 20:5w3 y 22:6w3 se incrementó significativamente a lo largo de la maduración del ovario (ANOVA, $p < 0.001$). Los mayores cambios en el contenido de ácidos grasos individuales también se observaron entre el estado I y II de la maduración gonadal. De tal forma que, el 18:2w6 aumentó su valor medio de $0.7 \pm 0.19 \mu\text{g/mg PS}$ a $1.1 \pm 0.25 \mu\text{g/mg PS}$ (incremento del 49.3%), el 18:3w6 bajó su valor medio de $2.1 \pm 0.18 \mu\text{g/mg PS}$ a $1.25 \pm 0.16 \mu\text{g/mg PS}$ (descenso del 40.2%), el 20:4w6 incrementó su valor medio de $1.2 \pm 0.30 \mu\text{g/mg PS}$ a $3.3 \pm 0.68 \mu\text{g/mg PS}$ (incremento del 164%), el 20:5w3 subió su valor medio de $17.6 \pm 1.37 \mu\text{g/mg PS}$ a $23.5 \pm 1.67 \mu\text{g/mg PS}$ (incremento del 33.5%) y el 22:6w3 elevó su valor medio de $12.9 \pm 1.26 \mu\text{g/mg PS}$ a $16.9 \pm 1.77 \mu\text{g/mg PS}$ (incremento del 30.5%). Por otro lado, cabe destacar que tanto el 20:4w6 como el 22:6w3 se mantuvieron sin cambios significativos en la segunda mitad del desarrollo (estado III y IV) (Tabla 6.7).

Las relaciones w3/w6, 18:1w7/18:1w9, 20:5w3/20:4w6 y 20:5w3/22:6w3 mostraron diferencias significativas a lo largo del desarrollo gonadal (ANOVA, $p < 0.001$) (Tabla 6.8). Las relaciones w3/w6 y 18:1w7/18:1w9 presentaron un patrón variable a lo largo del desarrollo, destacando que los incrementos o descensos más acusados se observaron en la relación 18:1w7/18:1w9. Así, al comienzo del desarrollo, entre el estado I y II se apreció un descenso en las relaciones del 5.1% y del 23.9% respectivamente, a continuación entre el estado II y III un incremento del 4.0% y del 34.3% respectivamente, y por último un nuevo descenso al final del desarrollo (entre estado III y IV, 1.4% y 6.4%, respectivamente), estimándose para la totalidad del desarrollo gonadal un descenso del 2.7% para la relación w3/w6 y un 4.3% para la relación 18:1w7/18:1w9.

Tabla 6.8. Variaciones en las relaciones w3/w6, 18:1w7/18:1w9, 20:5w3/20:4w6 y 20:5w3/22:6w3 junto con su incremento (%) desde el estado I al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar y los resultados del estadístico F y del nivel de significancia P de la ANOVA de una vía evaluando las diferencias entre los estados de maduración del ovario. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Estado de desarrollo gonadal | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--------------|--------|-------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | F | P |
| w3/w6 | 7.43 ± 0.66^a | 7.05 ± 1.26^b | 7.33 ± 0.62^{bc} | 7.23 ± 0.42^c | -2.69 | 239.30 | $p < 0.001$ |
| 18:1w7/18:1w9 | 0.46 ± 0.07^a | 0.35 ± 0.05^c | 0.47 ± 0.02^a | 0.44 ± 0.01^b | -4.35 | 105.00 | $p < 0.001$ |
| 20:5w3/22:6w3 | 1.37 ± 0.06^{ab} | 1.40 ± 0.14^a | 1.33 ± 0.07^b | 1.40 ± 0.10^a | 2.19 | 6.45 | $p < 0.001$ |
| 20:5w3/20:4w6 | 14.68 ± 2.90^a | 7.34 ± 1.11^b | 6.78 ± 0.57^b | 7.05 ± 0.84^b | -51.98 | 262.60 | $p < 0.001$ |

En cuanto a la relación 20:5w3/20:4w6 mostró un drástico descenso al comienzo de la maduración del ovario, desde valores entre 10.1 y 22.0 $\mu\text{g/mg PS}$ en el estado I a valores entre un 5.7 y un 9.2 $\mu\text{g/mg PS}$ en el estado II, lo que supone una reducción a la mitad de su valor medio inicial, y a partir de ese estado sus valores se mantienen sin cambios significativos (Tabla 6.8). La relación 20:5w3/22:6w3 no mostró cambios significativos al comienzo del desarrollo y luego experimentó un descenso entre el estado II y III y un leve incremento hacia el final de la maduración. En la relación 20:5w3/22:6w3 se apreció una ligera variación a lo largo del desarrollo, con un descenso del 5% entre el estado II y III y un incremento del 5.3% hacia el final de la maduración (estado III al IV), aumentando su valor medio de $1.3 \pm 0.07 \mu\text{g/mg PS}$ a $1.4 \pm 0.10 \mu\text{g/mg PS}$.

6.3.1.6. Composición de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) a lo largo de la maduración gonadal, con una disminución considerable del contenido en ADN y en ARN, sobre todo entre el estado II y el estado III, donde hubo un descenso del 65.7% para el ADN y del 48.2% para el ARN (Tabla 6.9). Para la totalidad de la maduración gonadal, el contenido en ADN del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) varió entre valores de 2.6 y 4.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS en el estado I y valores comprendidos entre un 0.2 y un 0.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS en el estado IV (descenso del 92%). Mientras que el contenido en ARN sufrió una bajada del 83.2%, desde valores iniciales entre un 12.6 y un 22.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS (estado II) alcanzando valores finales entre un 2.2 y un 4.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS (estado IV).

En cuanto a la relación ARN/ADN se apreció un patrón variable a lo largo del desarrollo gonadal (Tabla 6.9). De este modo, al comienzo del desarrollo, entre los estados I y II, se observó un descenso de la relación en torno a un 11.9%. A partir del estado II, donde los valores se situaron en un rango entre un 3.9 y un 5.7, esta relación se incrementó más del doble hasta el final del desarrollo del ovario (estado IV), donde se alcanzó un rango de valores entre un 7.6 y un 16.1.

Tabla 6.9. Variaciones en el contenido en ADN, ARN y relación ARN/ADN por mg de tejido (peso seco, PS) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado I al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar y los resultados del estadístico F y del nivel de significancia P de la ANOVA de una vía evaluando las diferencias entre los estados de maduración del ovario. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Estado de desarrollo gonadal | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------|--------|-------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | F | P |
| ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 3.43 \pm 0.48 ^a | 2.33 \pm 0.73 ^b | 0.80 \pm 0.21 ^c | 0.27 \pm 0.07 ^d | -92.13 | 412.90 | $p < 0.001$ |
| ARN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 17.74 \pm 2.75 ^a | 10.34 \pm 2.52 ^b | 5.36 \pm 1.14 ^c | 2.97 \pm 0.54 ^d | -83.26 | 464.80 | $p < 0.001$ |
| Relación ARN/ADN | 5.19 \pm 0.51 ^c | 4.57 \pm 0.49 ^c | 6.90 \pm 0.97 ^b | 11.17 \pm 2.01 ^a | 115.22 | 317.70 | $p < 0.001$ |
| ADN (% PS) | 0.34 \pm 0.05 | 0.23 \pm 0.07 | 0.08 \pm 0.02 | 0.03 \pm 0.01 | | | |
| ARN (% PS) | 1.77 \pm 0.28 | 1.03 \pm 0.25 | 0.54 \pm 0.11 | 0.30 \pm 0.05 | | | |

6.3.2. Variaciones entre puestas sucesivas en las características bioquímicas y biométricas del ovario en dos rías gallegas.

Para esta parte del estudio, no se tuvieron en cuenta los datos de ovarios en estado I (inmaduros), ya que este estado solo aparece en la primera puesta del periodo invernal. Se distinguieron dos periodos de desove dentro del ciclo de cría de *Maja brachydactyla*, un primer periodo de desove, en el que las hembras están realizando sus primeras puestas (diciembre a marzo), y un segundo periodo de desove (mayo a septiembre) que corresponde al momento del ciclo de cría donde las hembras están realizando la segunda y tercera puesta. El mes de abril no se incluyó por ser el mes intermedio entre puestas, donde puede existir solapamiento entre la primera puesta y las puestas posteriores.

6.3.2.1. Características biométricas del ovario y de los ovocitos

El peso del ovario (PFG y PSG) y el índice gonadosomático (IG) mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre los periodos de desove en la ría de Arousa, observándose que el ovario tiene un mayor peso medio (48.9 g de peso húmedo y 18.3 g de peso seco) e IG (3.8%) en el segundo periodo (Fig. 6.3, Tablas 6.10 y 6.11). Por otro lado, en la ría de A Coruña los valores de peso del ovario y del IG se mantuvieron sin diferencias entre periodos de desove (Fig. 6.3, Tablas 6.10 y 6.11).

Dentro de los periodos de desove, se observó la misma tendencia para las dos zonas geográficas, incrementándose significativamente (ANOVA, $p < 0.001$) el peso del ovario y el IG a medida que avanzan los estados de maduración (Fig. 6.3). Cabe destacar que los incrementos observados para la totalidad del desarrollo gonadal fueron mayores en los primeros periodos de desove, tanto en la ría de Arousa, donde el peso húmedo y el IG se incrementaron seis veces y el peso seco once veces, como en la ría de A Coruña, donde el aumento de peso y del IG fue de cinco veces para el peso húmedo y para el IG y de ocho veces para el peso seco (Tablas 6.10 y 6.11).

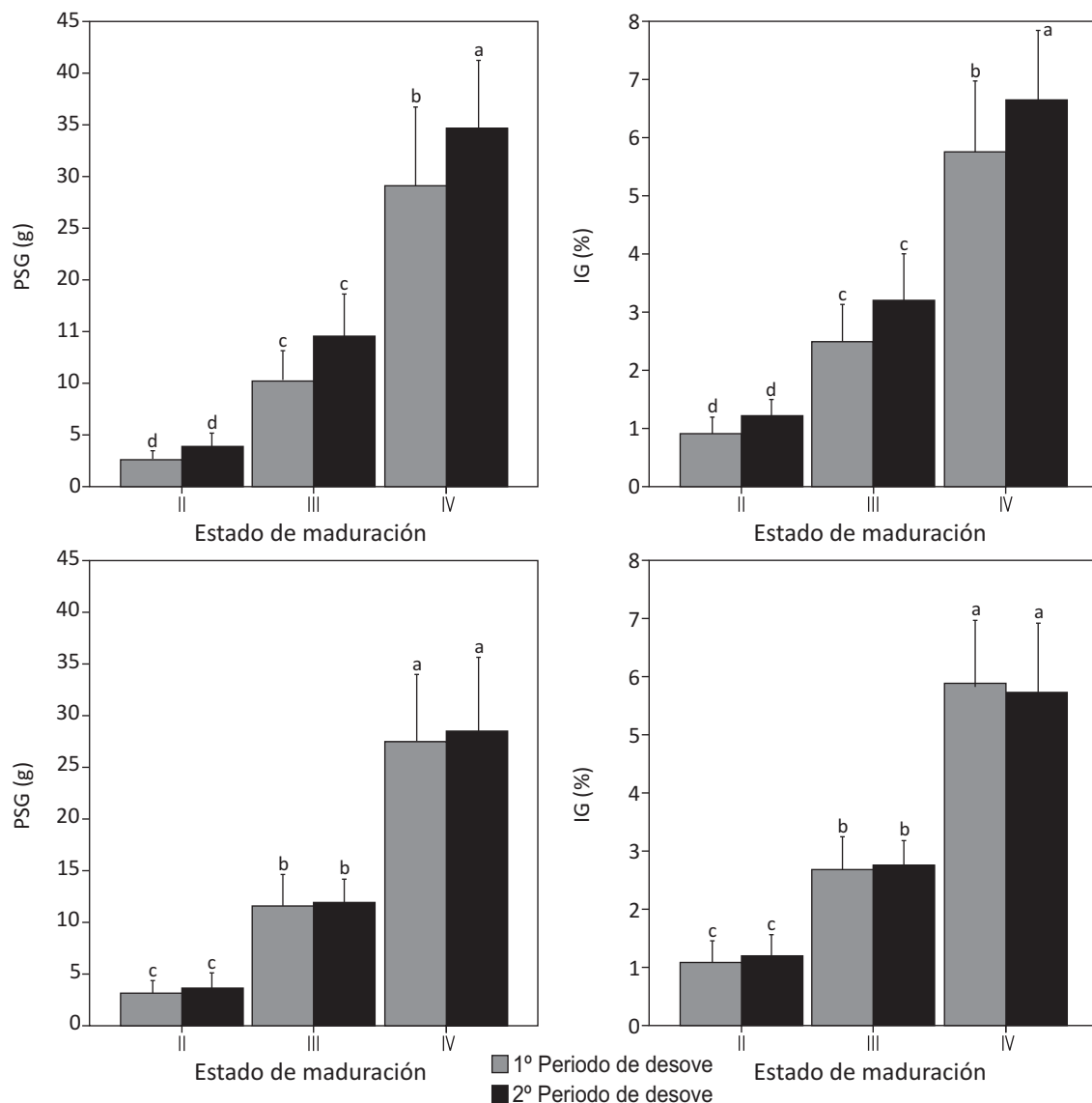


Fig. 6.3. Cambios en el peso seco del ovario (PSG, izquierda) e índice gonadosomático (IG, derecha) a lo largo del desarrollo gonadal y entre periodos de desove en la ría de Arousa (arriba) y en la ría de A Coruña (abajo). Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

Tabla 6.10. Variaciones en las características del ovario (PFG: peso fresco de la gónada, PSG: peso seco de la gónada e IG: índice gonadosomático) y de los ovocitos (DMAO: diámetro mayor y DMO: diámetro medio), junto con su incremento (%) desde el estado II al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal y entre periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre puestas (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Ría de Arousa | | | | | Ría de A Coruña | | | | |
|----------------------|------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|
| | Parámetros | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento |
| 1º Período de desove | IG (%) | 0.92 ± 0.3 ^d | 2.5 ± 0.7 ^c | 5.8 ± 1.3 ^b | 526.09 | 1.1 ± 0.4 ^c | 2.7 ± 0.6 ^b | 5.9 ± 1.2 ^a | 440.37 |
| | PFG (g) | 11.1 ± 3.4 ^d | 29.2 ± 7.6 ^c | 71.0 ± 18.1 ^b | 539.28 | 12.8 ± 4.8 ^c | 32.0 ± 7.0 ^b | 68.9 ± 16.6 ^a | 439.89 |
| | PSG (g) | 2.6 ± 0.9 ^d | 10.2 ± 3.1 ^c | 29.1 ± 8.0 ^b | 999.25 | 3.2 ± 1.3 ^c | 11.6 ± 3.2 ^b | 27.5 ± 6.8 ^a | 764.47 |
| | DMAO (μm) | 432.5 ± 52.6 ^c | 658.4 ± 68.6 ^b | 812.4 ± 22.0 ^a | 87.81 | 439.2 ± 48.1 ^c | 634.1 ± 68.5 ^b | 801.2 ± 21.9 ^a | 82.44 |
| | DMOV (μm) | 406.3 ± 50.2 ^c | 615.2 ± 61.0 ^b | 711.3 ± 5.8 ^a | 75.05 | 410.2 ± 45.5 ^c | 593.1 ± 64.7 ^b | 708.0 ± 5.5 ^a | 72.59 |
| 2º Período de desove | IG (%) | 1.2 ± 0.3 ^d | 3.2 ± 0.8 ^c | 6.6 ± 1.3 ^a | 445.08 | 1.2 ± 0.4 ^c | 2.8 ± 0.4 ^b | 5.7 ± 1.2 ^a | 377.50 |
| | PFG (g) | 16.9 ± 4.6 ^d | 39.0 ± 10.2 ^c | 86.9 ± 18.4 ^a | 412.92 | 15.2 ± 5.4 ^c | 33.7 ± 5.4 ^b | 71.4 ± 18.3 ^a | 369.07 |
| | PSG (g) | 3.9 ± 1.3 ^d | 14.6 ± 4.3 ^c | 34.7 ± 6.9 ^a | 780.71 | 3.7 ± 1.5 ^c | 11.9 ± 2.4 ^b | 28.5 ± 7.5 ^a | 678.69 |
| | DMAO (μm) | 428.2 ± 51.9 ^c | 648.1 ± 65.5 ^b | 807.7 ± 24.7 ^a | 88.64 | 431.4 ± 63.0 ^c | 623.2 ± 50.4 ^b | 797.1 ± 28.9 ^a | 84.77 |
| | DMO (μm) | 401.5 ± 49.8 ^c | 607.1 ± 61.7 ^b | 708.3 ± 6.0 ^a | 76.43 | 402.4 ± 60.4 ^c | 583.3 ± 49.6 ^b | 708.4 ± 9.0 ^a | 76.05 |

Tabla 6.11. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en las características del ovario (PFG: peso fresco de la gónada, PSG: peso seco de la gónada e IG: índice gonadosomático) y de los ovocitos (DMAO: diámetro mayor y DMO: diámetro medio) entre estados de maduración gonadal y entre periodos de desove en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Ría de Arousa | | | | | | Ría de A Coruña | | | |
|-----------------|-------------------|-----|---------|--------|-------------|-----------------|---------|--------|-------------|
| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P | gl | MC | F | P |
| IG (%) | Periodo de desove | 1 | 13.52 | 17.00 | $p < 0.001$ | 1 | 0.01 | 0.01 | 0.92 |
| | Estado desarrollo | 2 | 310.44 | 390.42 | $p < 0.001$ | 2 | 307.11 | 512.05 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.98 | 1.23 | 0.29 | 2 | 0.29 | 0.48 | 0.62 |
| | Error | 129 | 0.80 | | | 165 | 0.60 | | |
| PFG (g) | Periodo de desove | 1 | 3694 | 24.57 | $p < 0.001$ | 1 | 17 | 0.15 | 0.70 |
| | Estado desarrollo | 2 | 51178 | 340.32 | $p < 0.001$ | 2 | 44606 | 392.85 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 297 | 1.98 | 0.14 | 2 | 3 | 0.03 | 0.97 |
| | Error | 129 | 150 | | | 165 | 114 | | |
| PSG (g) | Periodo de desove | 1 | 456 | 18.39 | $p < 0.001$ | 1 | 0 | 0.03 | 0.87 |
| | Estado desarrollo | 2 | 9898 | 399.35 | $p < 0.001$ | 2 | 8531 | 450.95 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 54 | 2.18 | 0.12 | 2 | 2 | 0.09 | 0.92 |
| | Error | 129 | 25 | | | 165 | 19 | | |
| DMAO (μ m) | Periodo de desove | 1 | 3749 | 1.48 | 0.23 | 1 | 18608 | 7.13 | $p < 0.01$ |
| | Estado desarrollo | 2 | 1641917 | 650.11 | $p < 0.001$ | 2 | 1849697 | 708.85 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 126 | 0.05 | 0.95 | 2 | 155 | 0.06 | 0.94 |
| | Error | 129 | 2526 | | | 165 | 2609 | | |
| DMO (μ m) | Periodo de desove | 1 | 2882 | 1.42 | 0.24 | 1 | 13525 | 6.08 | $p < 0.05$ |
| | Estado desarrollo | 2 | 1092241 | 537.32 | $p < 0.001$ | 2 | 1301469 | 584.67 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 75 | 0.04 | 0.96 | 2 | 390 | 0.18 | 0.84 |
| | Error | 129 | 2033 | | | 165 | 2226 | | |

En la ría de Arousa el tamaño de los ovocitos de *M. brachydactyla*, en términos de diámetro mayor y diámetro medio, fue similar entre periodos de desove (Tablas 6.10 y 6.11). En cambio, en la ría de A Coruña, si se observaron variaciones significativas entre periodos de desove (ANOVA, $p < 0.001$), siendo los ovocitos del primer periodo de desove, con un diámetro mayor medio de $620.0 \pm 153.9 \mu\text{m}$ y un diámetro medio promedio de $568.0 \pm 129.5 \mu\text{m}$ los que presentaron mayor tamaño (Tablas 6.10 y 6.11). Dentro de cada periodo de desove, se apreció un incremento significativo del tamaño de los ovocitos (ANOVA, $p < 0.001$), sobre todo entre el estado II y III, donde el tamaño se incrementó en torno a un 45% para los dos periodos de desove de las dos zonas de estudio.

Se ajustó un modelo de regresión lineal con logaritmos para las relaciones índice gonadosomático-diámetro medio de los ovocitos y para el índice gonadosomático-diámetro mayor de los ovocitos a lo largo de la maduración en las dos zonas de estudio. El IG mostró una relación positiva significativa tanto con el diámetro mayor ($r^2 = 0.95$, $p < 0.001$ para Arousa, y $r^2 = 0.97$, $p < 0.001$ para A Coruña) como con el diámetro medio ($r^2 = 0.91$, $p < 0.001$ para Arousa, y $r^2 = 0.97$, $p < 0.001$ para A Coruña) de los ovocitos en las dos zonas de estudio (Fig. 6.4).

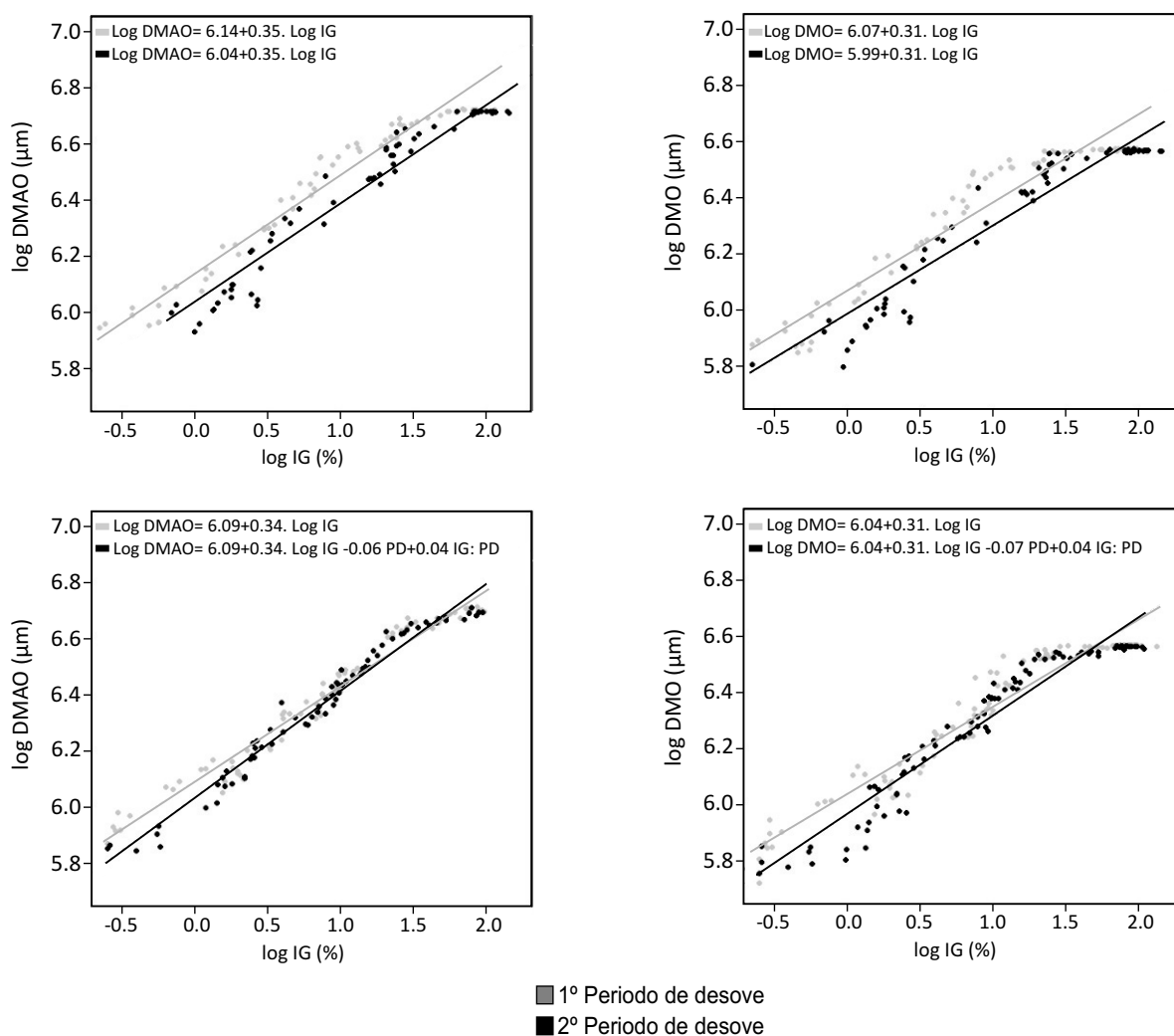


Fig. 6.4. Cambios en el índice gonadosomático (IG) en función del diámetro mayor (DMAO, izquierda) y el diámetro medio (DMO, derecha) de los ovocitos de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa (arriba) y en la ría de A Coruña (abajo). Se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

El ANCOVA mostró diferencias significativas entre periodos de desove para la relación IG-DMAO y la relación IG-DMO en la ría de A Coruña, apreciándose una interacción significativa entre IG y periodo de desove ($p < 0.001$) con valores para las pendientes de 0.34 (DMAO) y 0.31 (DMO) para el primer periodo y 0.38 (DMAO) y 0.35 (DMO) para el segundo periodo de desove (Fig. 6.4). Así, para valores de IG entre 0.5% y 4.0% (correspondientes a ovarios en estado II o III) los valores de DMAO o DMO fueron superiores en el primer periodo mientras que para valores altos de IG (correspondientes a ovarios en estado IV) fueron similares en los dos periodos de desove. En la ría de Arousa las relaciones IG-DMAO e IG-DMO no mostraron interacción entre el IG y el periodo de desove, observándose que en el primer periodo de desove el incremento del DMAO o del DMO para un incremento dado de IG fue superior al del segundo periodo de desove.

6.3.2.2. Composición básica del ovario

No se apreciaron variaciones en el contenido en agua, materia orgánica y cenizas del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) entre periodos de desove en la ría de Arousa (Fig. 6.5, Tablas 6.12 y 6.13). En cambio, en la ría de A Coruña el contenido en agua y en materia orgánica del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) si presentó variaciones significativas (ANOVA, $p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente), siguiendo un patrón contrario entre las dos variables (Fig. 6.6, Tablas 6.12 y 6.13). Así, el contenido en materia orgánica fue superior en el primer periodo, con un valor medio de $274.7 \pm 73.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ PH, mientras que el contenido en agua, con un valor medio de $679.4 \pm 73.71 \mu\text{g}/\text{mg}$ PH, fue más elevado en el segundo periodo de desove.

Dentro de cada periodo de desove, se observó una tendencia similar en las dos zonas geográficas, con diferencias significativas en las tres variables a medida que avanza el desarrollo del ovario (ANOVA, $p < 0.001$) y que aumenta el índice gonadosomático (ANCOVA, $p < 0.001$) (Figs. 6.5 y 6.6, Tablas 6.12 y 6.13). De tal manera que, se produjo un gran descenso del contenido en agua (en torno a una media del $22.4 \pm 0.16\%$ en Arousa y del $20.8 \pm 0.76\%$ en A Coruña), un incremento considerable de materia orgánica, sobre todo entre el estado II y III donde se observaron aumentos de materia orgánica entre un 64.6% y un 97.4% para la ría de Arousa y entre un 65.2% y un 74.0% para la ría de A Coruña, y una ligera disminución de las cenizas, fundamentalmente, entre el estado II y III, donde descendió su contenido una media de $15.8 \pm 6.0\%$ en la ría de Arousa y un $12.5 \pm 5.7\%$ en la ría de A Coruña (Figs. 6.5 y 6.6). Por otro lado, la interacción periodo de desove-estado de desarrollo mostró diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) para el contenido en agua y materia orgánica del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) en la ría de Arousa. Las mayores diferencias se observaron en el estado III del desarrollo, con valores superiores en el primer periodo de desove para el agua ($652.8 \pm 21.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ PH) y en el segundo periodo de desove para la materia orgánica ($310.7 \pm 27.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ PH).

En las dos zonas geográficas, el IG mostró una relación positiva significativa ($r^2 = 0.90$, $p < 0.001$ para Arousa, y $r^2 = 0.97$, $p < 0.001$ para A Coruña) con la materia orgánica en los dos periodos de desove, mientras que para el contenido en agua del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) la relación fue negativa significativa ($r^2 = 0.85$, $p < 0.001$ para Arousa, y $r^2 = 0.84$, $p < 0.001$ para A Coruña) (Figs. 6.5 y 6.6). En cuanto al contenido de cenizas del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH), la relación negativa con el IG fue también significativa pero con un coeficiente de correlación bajo ($r^2 = 0.27$ para Arousa, y 0.25 para A Coruña). En la relación IG-materia orgánica se observó una interacción significativa entre el IG y el periodo de desove (ANCOVA, $p < 0.001$), con valores para las pendientes de 0.36 (Arousa) y 0.36 (A Coruña) para el primer periodo y 0.43 (Arousa) y 0.42 (A Coruña) para el segundo periodo de desove. Para la mayor parte del rango de valores del IG (0.5% a 4.4% en Arousa y 0.5% a 4.0% en A Coruña, correspondientes al estado II y III) el contenido en materia orgánica del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) fue mayor en el primer periodo de desove, mientras que para los valores de IG más elevados (correspondientes con ovarios maduros o estado IV) los valores de materia orgánica fueron similares entre periodos de desove. Por otro lado, la relación IG-agua no mostró interacción entre el IG y el periodo de desove, apreciándose que el incremento del agua para un incremento dado del IG fue superior en el segundo periodo de desove en las dos zonas geográficas.

Tabla 6.12. Variaciones en el contenido en agua, materia orgánica (MO) y cenizas por mg de tejido (peso húmedo, PH) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado II al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal y entre periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Ría de Arousa | | | | | Ría de A Coruña | | | | |
|----------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------|
| Parámetros | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | |
| 1º Período de desove | Agua (µg/mg PH) | 762.3 ± 23.4 ^a | 652.8 ± 21.1 ^b | 590.5 ± 18.5 ^d | -22.53 | 754.3 ± 19.8 ^a | 642.3 ± 28.1 ^b | 601.2 ± 26.3 ^c | -20.30 |
| | MO (µg/mg PH) | 173.9 ± 30.6 ^d | 286.3 ± 21.9 ^c | 353.0 ± 18.6 ^a | 103.04 | 182.2 ± 28.7 ^c | 300.9 ± 29.3 ^b | 343.1 ± 28.1 ^a | 88.33 |
| | Cenizas (µg/mg PH) | 63.8 ± 9.3 ^{ab} | 61.0 ± 9.2 ^b | 56.4 ± 7.7 ^b | -11.60 | 63.5 ± 10.6 ^{ab} | 56.8 ± 10.6 ^b | 55.7 ± 11.1 ^b | -12.27 |
| | Agua (% PH) | 76.2 ± 2.3 | 65.3 ± 2.1 | 59.0 ± 1.8 | | 75.4 ± 2.0 | 64.2 ± 2.8 | 60.1 ± 2.6 | |
| | MO (% PH) | 17.4 ± 3.1 | 28.6 ± 2.2 | 35.3 ± 1.9 | | 18.2 ± 2.9 | 30.1 ± 2.9 | 34.3 ± 2.8 | |
| | Cenizas (% PH) | 6.4 ± 0.9 | 6.1 ± 0.9 | 5.6 ± 0.8 | | 6.3 ± 1.1 | 5.7 ± 1.1 | 5.6 ± 1.1 | |
| 2º Período de desove | Agua (µg/mg PH) | 771.5 ± 23.2 ^a | 630.5 ± 26.5 ^c | 599.4 ± 17.4 ^d | -22.31 | 765.0 ± 23.7 ^a | 647.9 ± 24.6 ^b | 601.5 ± 17.1 ^c | -21.37 |
| | MO (µg/mg PH) | 157.4 ± 26.7 ^d | 310.7 ± 27.7 ^b | 343.1 ± 19.7 ^a | 117.99 | 169.7 ± 32.6 ^c | 295.2 ± 22.6 ^b | 341.3 ± 24.2 ^a | 101.15 |
| | Cenizas (µg/mg PH) | 71.1 ± 9.6 ^a | 58.8 ± 8.6 ^b | 57.5 ± 10.9 ^b | -19.13 | 65.3 ± 11.5 ^a | 56.8 ± 10.3 ^b | 57.1 ± 12.4 ^{ab} | -12.49 |
| | Agua (% PH) | 77.1 ± 2.3 | 63.0 ± 2.6 | 59.9 ± 1.7 | | 76.5 ± 2.4 | 64.8 ± 2.4 | 60.1 ± 1.7 | |
| | MO (% PH) | 15.7 ± 2.7 | 31.1 ± 2.8 | 34.3 ± 2.0 | | 17.0 ± 3.3 | 29.5 ± 2.3 | 34.1 ± 2.4 | |
| | Cenizas (% PH) | 7.1 ± 1.0 | 5.9 ± 0.9 | 5.7 ± 1.1 | | 6.5 ± 1.1 | 5.7 ± 1.0 | 5.7 ± 1.2 | |

Tabla 6.13. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido en agua, materia orgánica (MO) y cenizas por mg de tejido (peso húmedo, PH) entre estados de maduración gonadal y entre periodos de desove en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Ría de Arousa | | | | | | Ría de A Coruña | | | |
|--|-------------------|-----|--------|--------|-------------|-----------------|--------|--------|-------------|
| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P | gl | MC | F | P |
| Agua ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | Periodo de desove | 1 | 54 | 0.12 | 0.74 | 1 | 6938 | 12.42 | $p < 0.001$ |
| | Estado desarrollo | 2 | 353789 | 746.54 | $p < 0.001$ | 2 | 382780 | 685.06 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 3633 | 7.67 | $p < 0.001$ | 2 | 373 | 0.67 | 0.51 |
| | Error | 129 | 474 | | | 165 | 559 | | |
| MO ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | Periodo de desove | 1 | 389 | 0.66 | 0.42 | 1 | 8627 | 10.98 | $p < 0.01$ |
| | Estado desarrollo | 2 | 399107 | 672.79 | $p < 0.001$ | 2 | 425489 | 541.41 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 5327 | 8.98 | $p < 0.001$ | 2 | 417 | 0.53 | 0.59 |
| | Error | 129 | 593 | | | 165 | 786 | | |
| Cenizas ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) | Periodo de desove | 1 | 152.9 | 1.76 | 0.1866 | 1 | 91.8 | 0.75 | 0.39 |
| | Estado desarrollo | 2 | 1365.3 | 15.74 | $p < 0.001$ | 2 | 1180.4 | 9.60 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 250 | 2.88 | 0.06 | 2 | 12.4 | 0.10 | 0.90 |
| | Error | 129 | 86.7 | | | 165 | 122.9 | | |

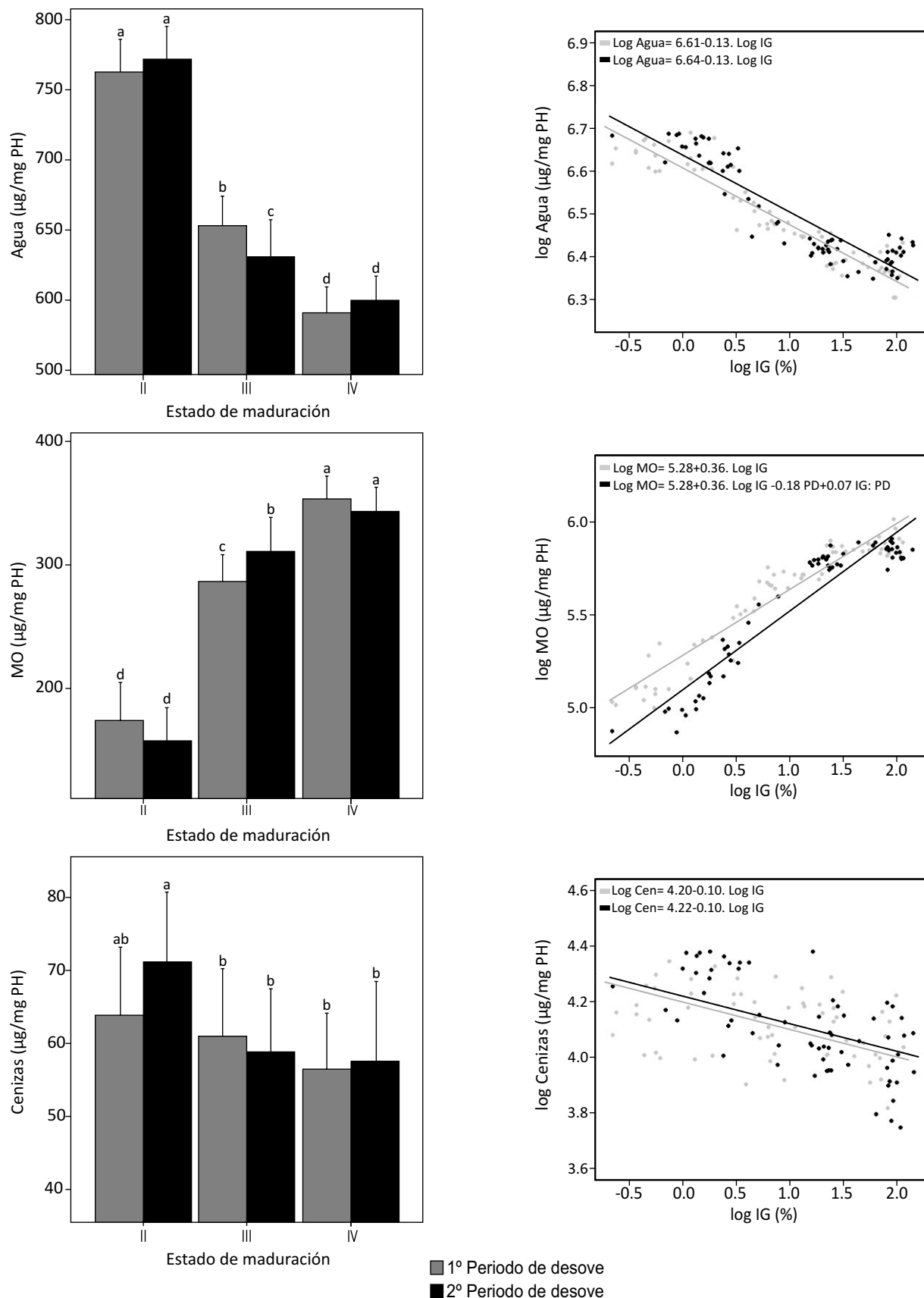


Fig. 6.5. Cambios en el contenido en agua, materia orgánica (MO) y cenizas (Cen) por mg de tejido (pero húmedo, PH) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

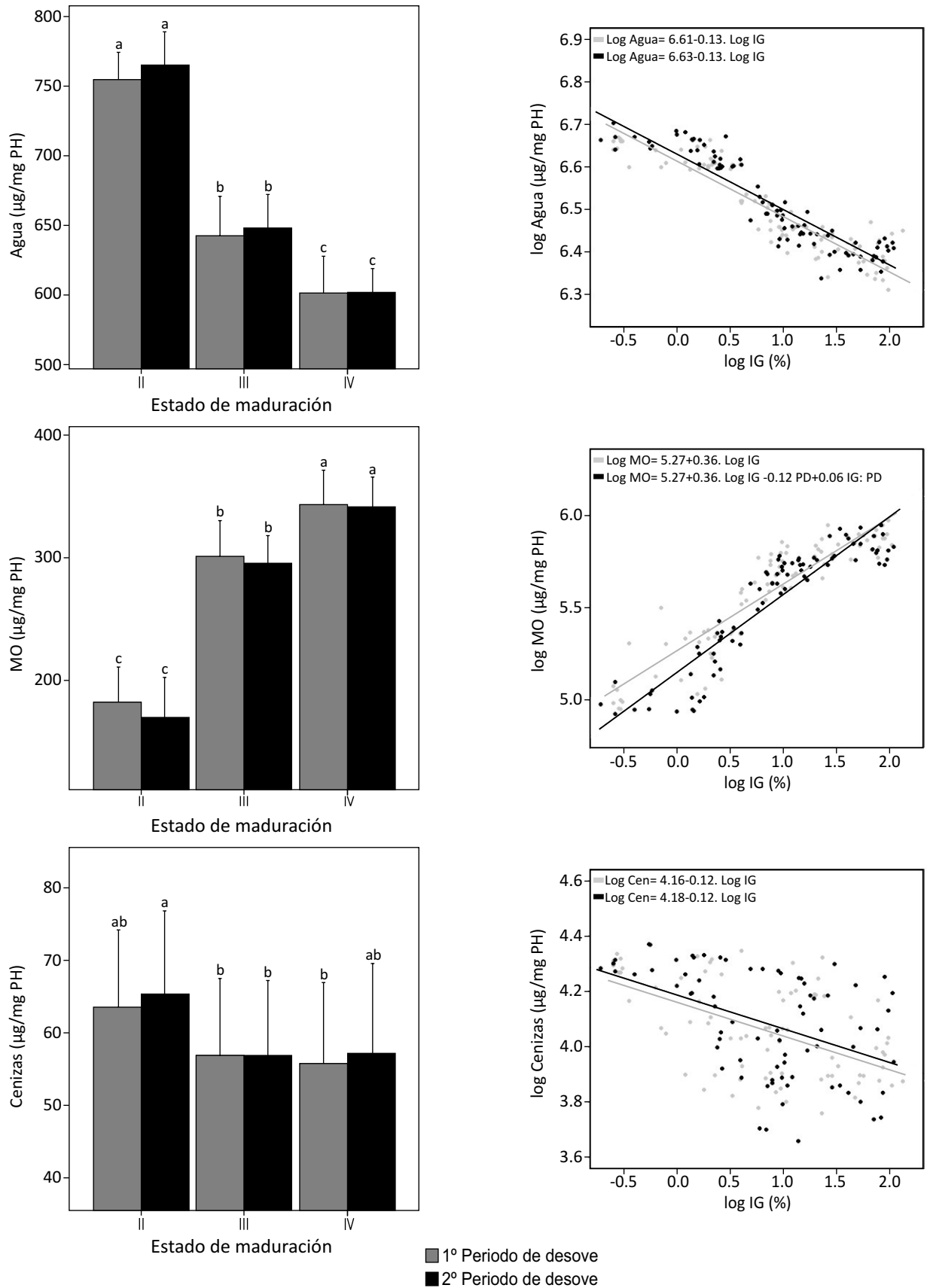


Fig. 6.6. Cambios en el contenido en agua, materia orgánica (MO) y cenizas (Cen) por mg de tejido (pero húmedo, PH) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de A Coruña. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

6.3.2.3. Composición bioquímica del ovario

En la composición bioquímica del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS), los carbohidratos presentaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre periodos de desove tanto en la ría de Arousa como en la ría de A Coruña (Tablas 6.14 y 6.15). El contenido en carbohidratos fue mayor en los ovarios del primer periodo de desove, con valores medios de $48.7 \pm 9.23 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para la ría de Arousa y de $70.4 \pm 8.36 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para la ría de A Coruña (Tabla 6.14).

Para la relación C/N también se apreciaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) entre periodos de desove, pero solamente en la ría de A Coruña, con valores más elevados en el primer periodo de desove, con un promedio de 4.31 ± 0.23 (Tablas 6.14 y 6.15). En cada periodo de desove hubo diferencias significativas para todas las variables de estudio a medida que avanza el desarrollo del ovario (ANOVA, $p < 0.001$) y con el aumento del índice gonadosomático (ANCOVA, $p < 0.001$) en las dos zonas geográficas (Figs. 6.7 a 6.12, Tablas 6.14 y 6.15).

El patrón de variación general que presentaron las diferentes variables durante la maduración del ovario mostró un incremento de carbono y de lípidos y un descenso ligero de proteínas, y más elevado, en el caso de los carbohidratos. La mayor subida de carbono y de lípidos en el ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) se observó entre el estado II y III de cada periodo de desove, con un aumento medio del carbono entre un 8.3% y un 8.8% en la ría de Arousa y entre un 8.5% y un 8.7% en la ría de A Coruña, y un incremento medio de lípidos entre 34.8% y el 41.1% en la ría de Arousa y entre el 26.7% y el 33.4% en la ría de A Coruña (Figs. 6.7 a 6.10). El principal descenso en el contenido de proteínas en el ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) también se observó entre el estado II y III, con una disminución media de $2.0 \pm 0.1\%$ en la ría de Arousa y de $0.7 \pm 0.2\%$ en la ría de A Coruña. Y por último, el descenso más acusado de los carbohidratos se produjo entre el estado III y IV de cada periodo de desove, con rango de descenso entre un 5.2% y un 7.5% en la ría de Arousa y entre un 1.6% y un 4.8% en la ría de A Coruña.

Las relaciones C/N y lípidos/proteínas mostraron el mismo patrón de incrementos que el carbono y los lípidos, apreciándose su mayor subida entre el estado II y III de desarrollo gonadal, donde los valores de la relación C/N se elevaron una media de $10.9 \pm 0.18\%$ en la ría de Arousa y de $9.2 \pm 0.03\%$ en la ría de A Coruña, y los de la relación lípidos/proteínas una media de $42.0 \pm 8.0\%$ en la ría de Arousa y de $33.4 \pm 4.2\%$ en la ría de A Coruña (Figs. 6.11 y 6.12).

Por otro lado, en la ría de Arousa el efecto de la interacción entre el periodo de desove y el estado de desarrollo fue significativa (ANOVA, $p < 0.01$) para el contenido de carbono, de lípidos, de la relación C/N y de la relación lípidos/proteínas (Tablas 6.14 y 6.15). Las mayores diferencias se observaron en el estado IV del desarrollo, con un mayor valor medio de todas las variables en el segundo periodo de desove ($500.2 \pm 7.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para el carbono, $238.4 \pm 6.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para los lípidos, 4.55 ± 0.07 para la relación C/N y 0.38 ± 0.01 para la relación lípidos/proteínas). En lo que respecta a la ría de A Coruña, las variables que mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) para la interacción fueron los lípidos, los carbohidratos y la relación lípidos/proteínas (Tablas 6.14 y 6.15). El estado IV, al igual que en la ría de Arousa, fue el que presentó mayores diferencias en la interacción, siendo más elevados los valores de carbohidratos ($64.5 \pm 8.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS) en el primer periodo de desove y, por el contrario, más altos los valores de lípidos y de la relación lípidos/proteínas en el segundo periodo de desove ($227.0 \pm 5.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para los lípidos y 0.36 ± 0.01 para la relación lípidos/proteínas).

En cuanto al contenido energético del ovario (J/mg PS), en términos de energía^s y de energía^w, no fue diferente entre periodos de desove para ninguna de las dos zonas de estudio (Figs. 6.11 y 6.12, Tablas 6.14 y 6.15). Sin embargo, dentro de cada periodo de desove, tanto en la ría de Arousa como en la ría de A Coruña, se observó un incremento significativo del contenido energético del ovario (J/mg PS) (energía^s y de energía^w) durante la maduración (ANOVA, $p < 0.001$) y con el aumento del índice gonadosomático (ANCOVA, $p < 0.001$) (Figs. 6.7 a 6.12, Tablas 6.14 y 6.15).

Para la totalidad de la maduración gonadal (estado II al IV), el incremento medio del contenido energético del ovario fue de 12.5 ± 1.29 J/mg PS (energía^s) o 14.3 ± 2.19 J/mg PS (energía^w) en los periodos de desove de la ría de Arousa y de 12.1 ± 1.22 J/mg PS (energía^s) o 12.5 ± 2.16 J/mg PS (energía^w) en los periodos de desove de la ría de A Coruña (Tablas 6.14 y 6.15). La interacción periodo de desove-estado de desarrollo fue significativa (ANOVA, $p < 0.01$) para la energía^s en la ría de Arousa y para la energía^w en las dos zonas de estudio. En las dos variables de energías se apreciaron las mayores diferencias en el estado más avanzado de desarrollo (estado IV), siendo más elevados sus valores en los segundos periodos de desove (23.0 ± 0.34 J/mg PS y 25.2 ± 0.30 J/mg PS respectivamente en la ría de Arousa y 25.0 ± 0.31 J/mg PS para la energía^w en la ría de A Coruña).

Para las dos zonas geográficas, el patrón de relación entre el índice gonadosomático (IG) y las variables de estudio fue similar en cada periodo de desove (Figs. 6.7 a 6.12). El IG mostró una relación positiva significativa (ANCOVA, $p < 0.001$) con el contenido de carbono ($r^2 = 0.86$ para Arousa y $r^2 = 0.82$ para A Coruña), de lípidos ($r^2 = 0.94$ para Arousa y $r^2 = 0.83$ para A Coruña), de la relación C/N ($r^2 = 0.86$ para Arousa y $r^2 = 0.78$ para A Coruña), de la relación lípidos/proteínas ($r^2 = 0.90$ para Arousa y $r^2 = 0.84$ para A Coruña), y de las dos variables de energía (energía^s, $r^2 = 0.86$ para Arousa y $r^2 = 0.83$ para A Coruña y energía^w, $r^2 = 0.86$ para Arousa y $r^2 = 0.82$ para A Coruña). Por el contrario, el IG mostró una relación negativa significativa (ANCOVA, $p < 0.001$) con el contenido de proteínas ($r^2 = 0.48$ para Arousa y $r^2 = 0.29$ para A Coruña) y de carbohidratos ($r^2 = 0.24$ para Arousa y $r^2 = 0.18$ para A Coruña). En ambos casos los valores de correlación obtenidos fueron, en general, bajos, especialmente en la relación del IG con el contenido de carbohidratos.

El ANCOVA mostró diferencias significativas entre periodos de desove para la relación del IG con el contenido en carbono ($p < 0.001$), con el contenido en lípidos ($p < 0.001$), con el contenido en carbohidratos ($p < 0.001$, solo en A Coruña), para la relación C/N ($p < 0.05$ para Arousa y $p < 0.01$ para A Coruña), para la relación lípidos/proteínas ($p < 0.01$ para Arousa y $p < 0.001$ para A Coruña) y con el contenido de energía, tanto energía^s ($p < 0.01$ para A Coruña y $p < 0.001$ para Arousa) como energía^w ($p < 0.001$), observándose una interacción significativa entre IG y periodo de desove (Fig. 6.7 a 6.12). En general a valores de IG entre 0.5% y 4.4% para Arousa y entre 0.5% y 3.8% para A Coruña, todas estas variables presentaron valores más superiores en el primer periodo de desove, mientras que a valores más elevados de IG se apreciaron valores similares en los dos periodos de desove. En cuanto a la relación del IG con las proteínas del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) y con los carbohidratos (en el caso de Arousa), no presentó interacción significativa entre periodos de desove, siendo el incremento de proteínas o carbohidratos para un incremento dado de IG igual en los dos periodos de desove.

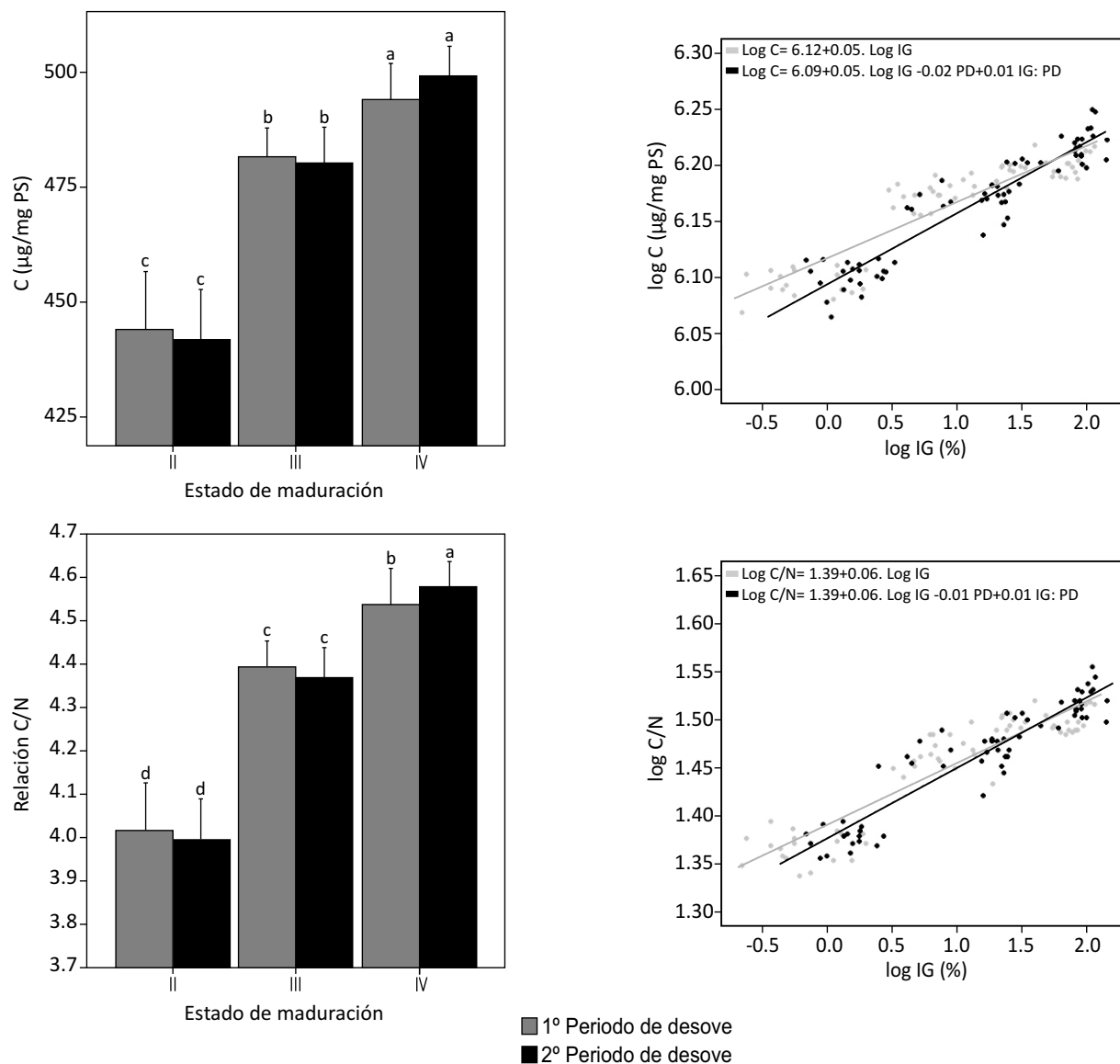


Fig. 6.7. Cambios en el contenido de carbono (C) y de la relación (C/N) por mg de tejido (pero seco, PS) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desove de *M.brachydactyla* en la ría de Arousa. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

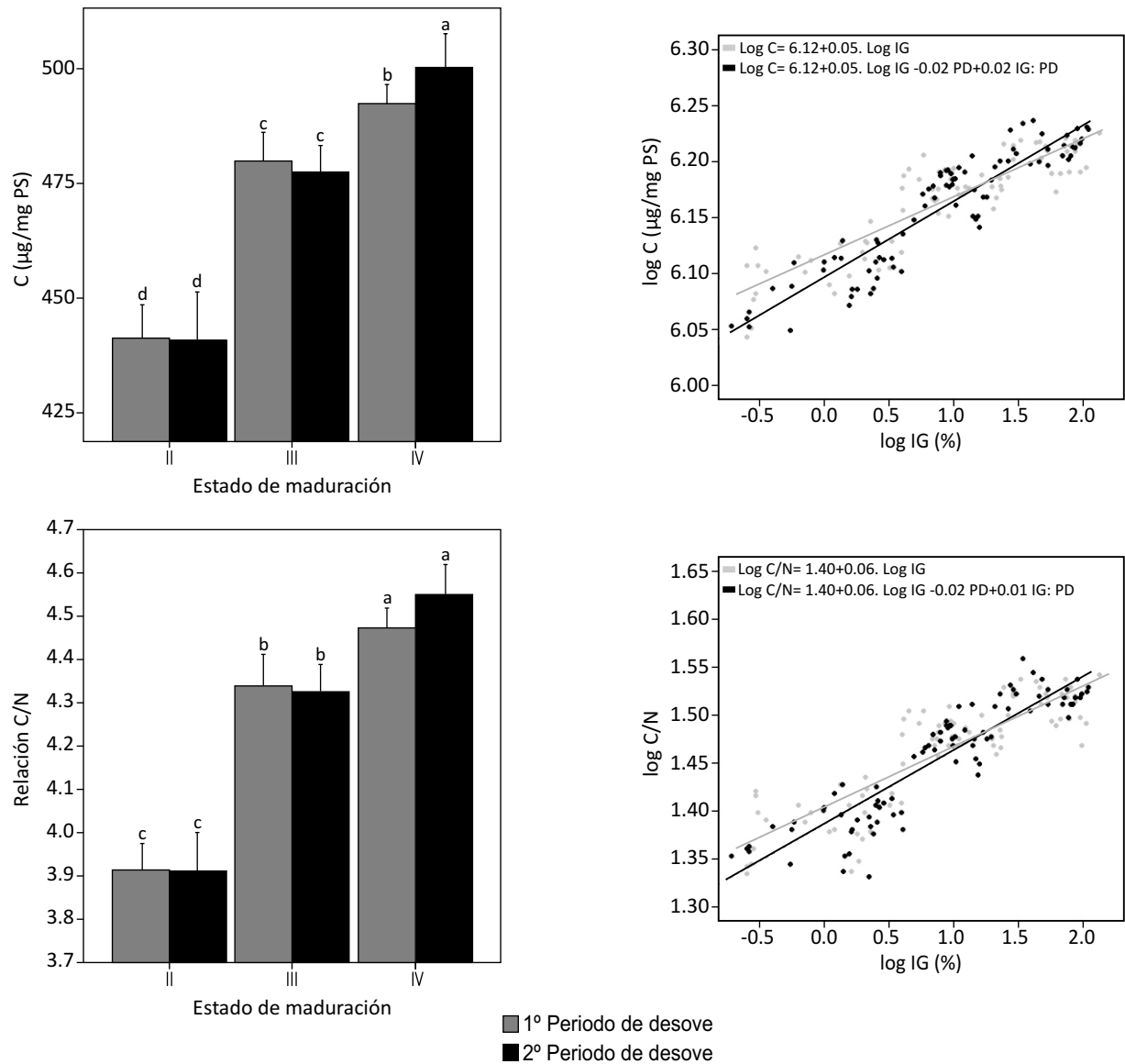


Fig. 6.8. Cambios en el contenido de carbono (C) y de la relación (C/N) por mg de tejido (pero seco, PS) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de A Coruña. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

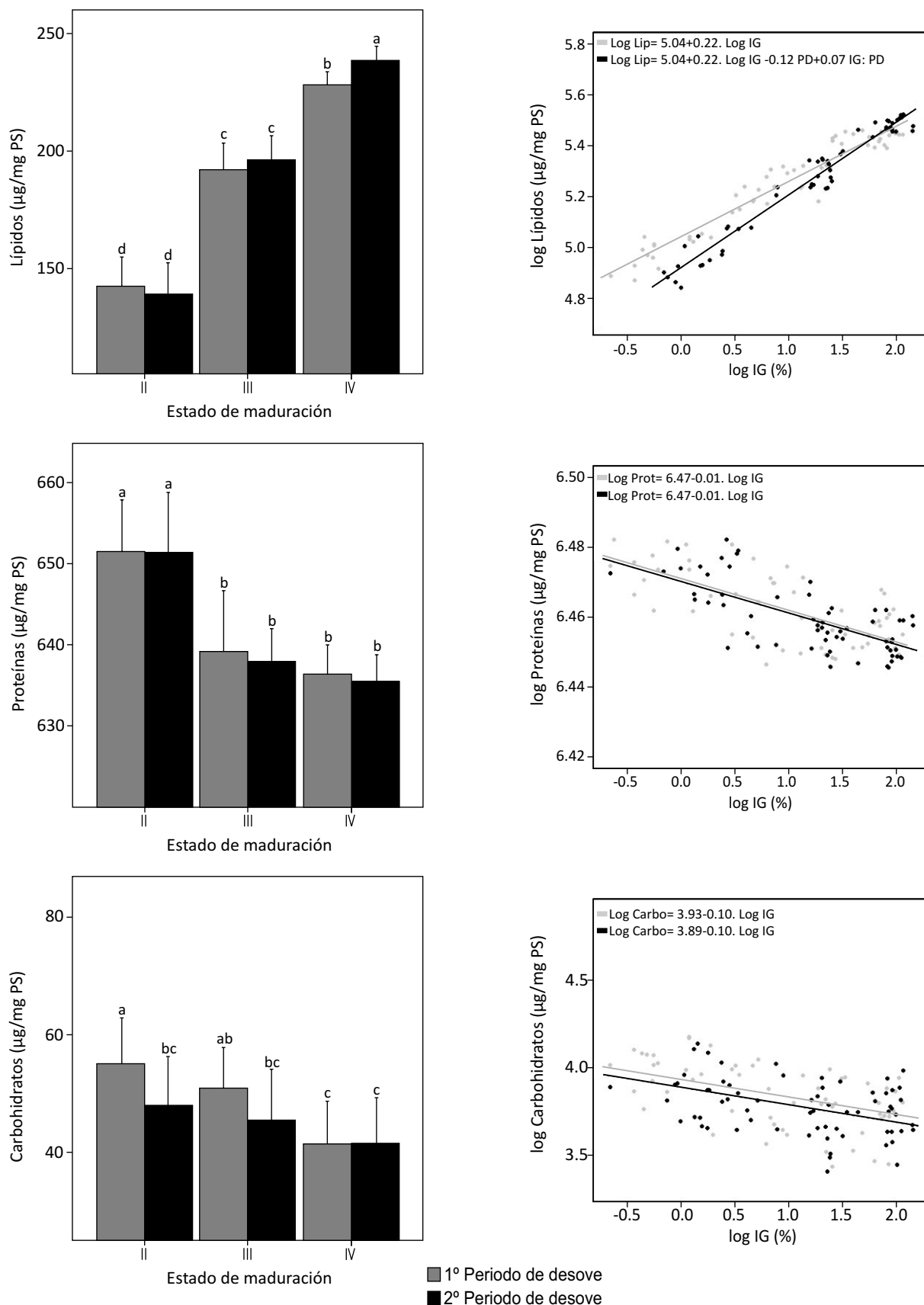


Fig. 6.9. Cambios en el contenido de lípidos (Lip), de proteínas (Prot) y de carbohidratos (Carbo) por mg de tejido (pero seco, PS) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

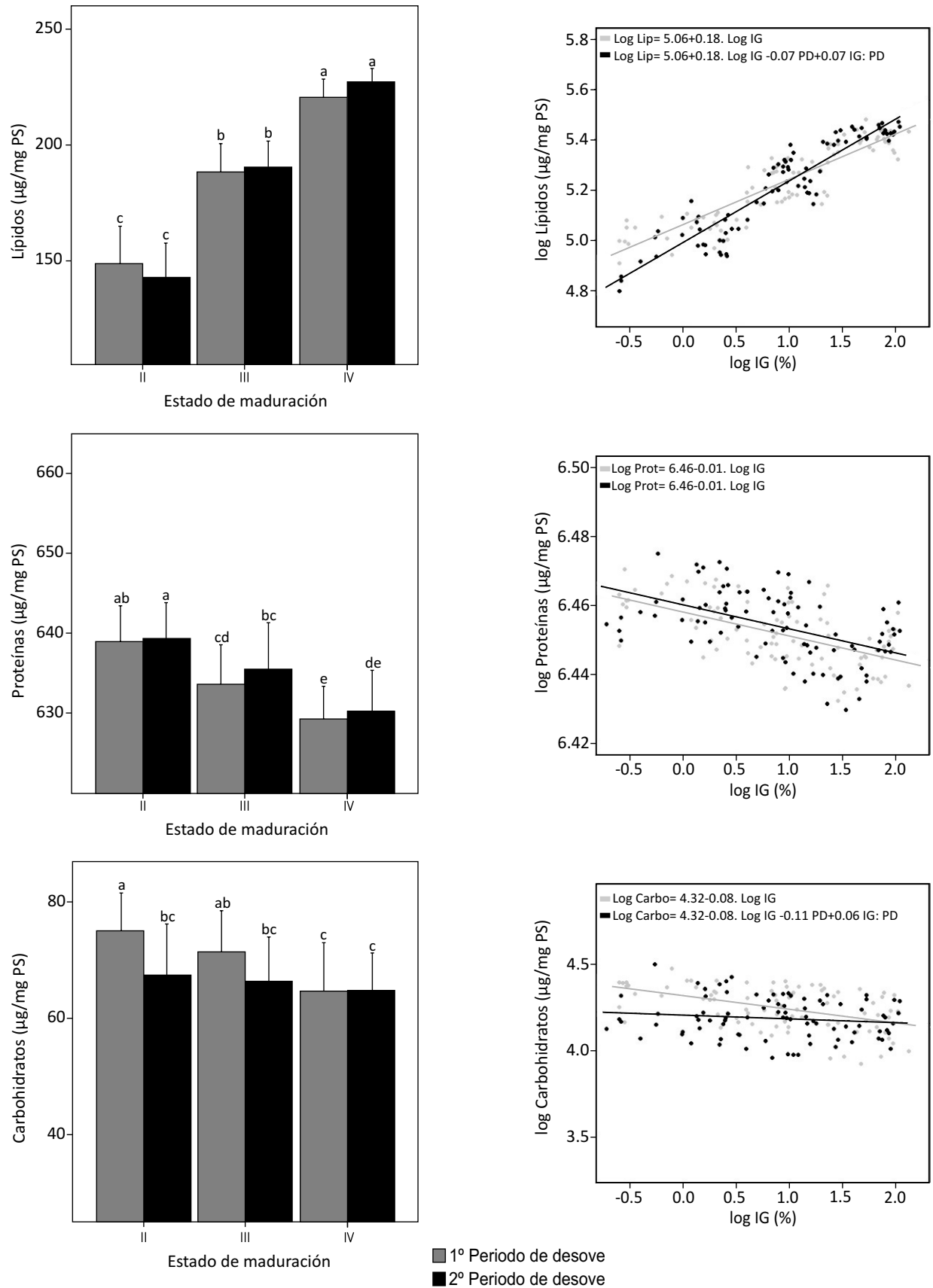


Fig. 6.10. Cambios en el contenido de lípidos (Lip), de proteínas (Prot) y de carbohidratos (Carbo) por mg de tejido (pero seco, PS) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desova de *M.brachydactyla* en la ría de A Coruña. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desova (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desova (PD).

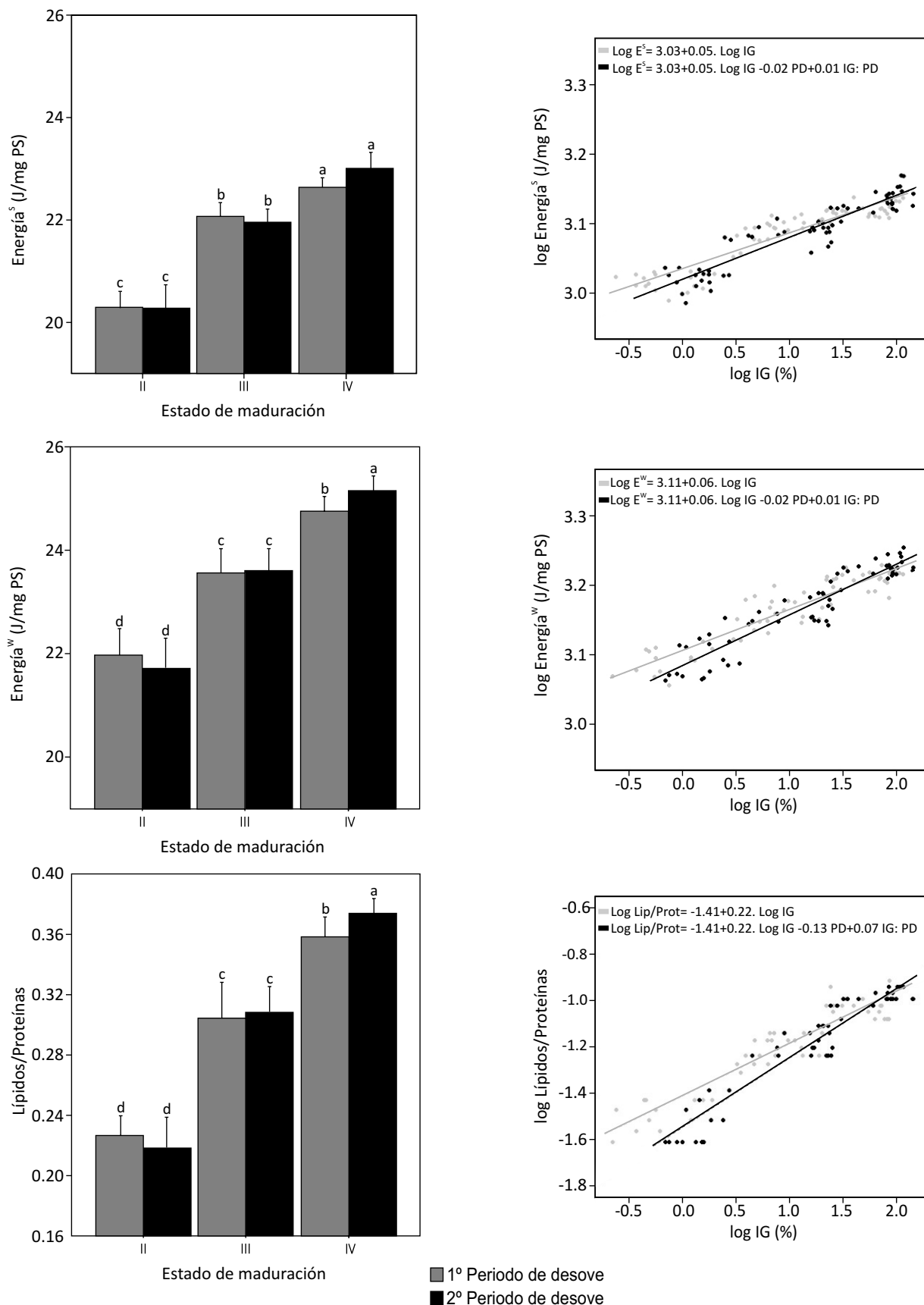


Fig. 6.11. Cambios en el contenido de energía^S (E^S), energía^W (E^W) y relación lípidos/proteínas (Lip/Prot) por mg de tejido (pero seco, PS) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

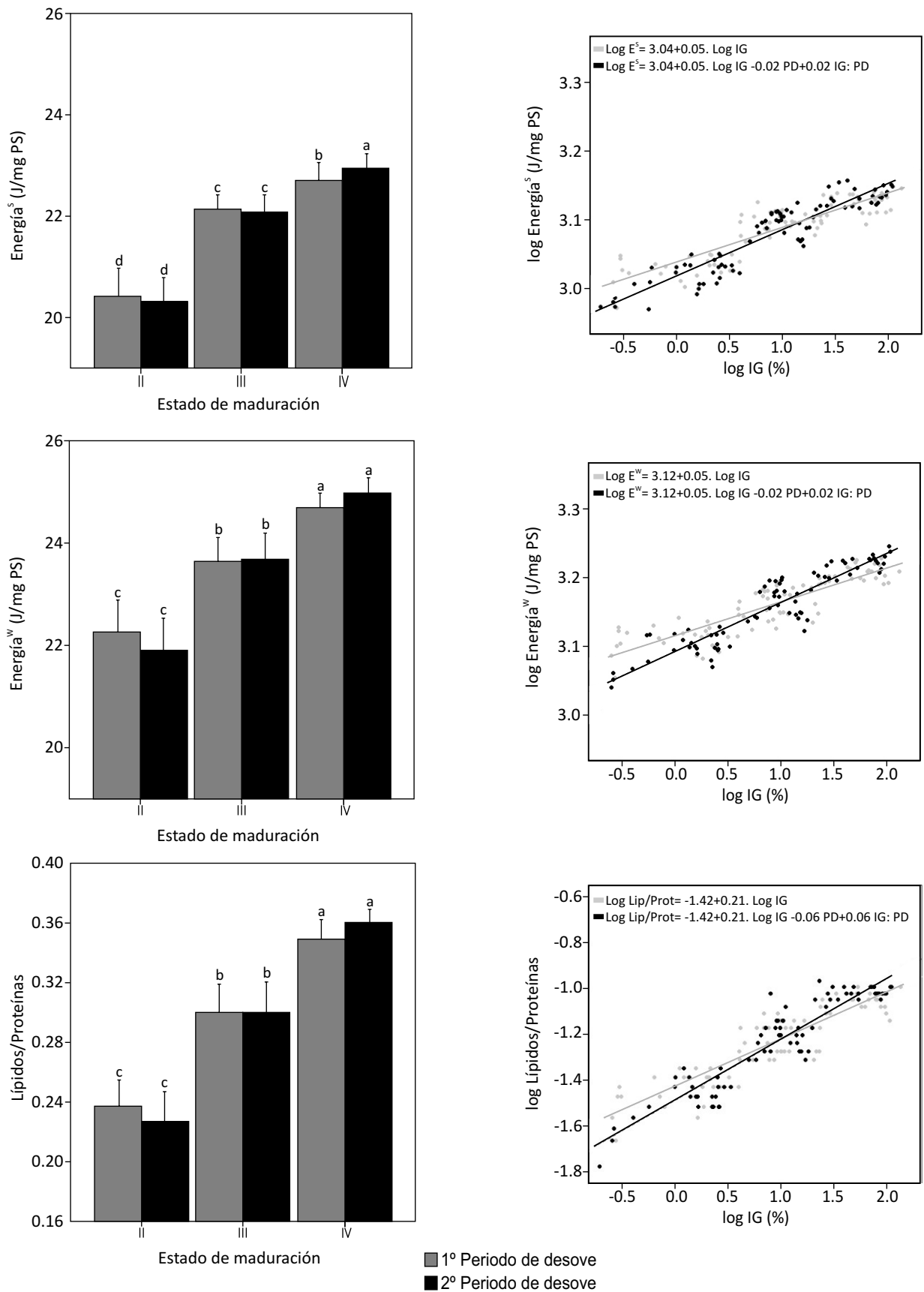


Fig. 6.12. Cambios en el contenido de energía^S (E^S), energía^W (E^W) y relación lípidos/proteínas (Lip/Prot) por mg de tejido (pero seco, PS) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de A Coruña. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

Tabla 6.14. Variaciones en el contenido de carbono (C), lípidos (Lip), proteínas (Prot), carbohidratos (Carbo), relación C/N, relación lípidos/proteínas (Lip/Prot), energía^s y energía^w por mg de tejido (peso seco, PS) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado II al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal y entre periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Ría de Arousa | | | | | Ría de A Coruña | | | | |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------|
| Parámetros | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | |
| 1º Período de desove | C (µg/mg PS) | 441.1 ± 7.3 ^d | 479.8 ± 6.2 ^c | 492.3 ± 4.1 ^b | 11.61 | 443.9 ± 12.6 ^c | 481.5 ± 6.3 ^b | 494.0 ± 7.9 ^a | 11.27 |
| | Lip (µg/mg PS) | 142.3 ± 12.5 ^d | 191.9 ± 11.3 ^c | 228.1 ± 5.6 ^b | 60.25 | 148.6 ± 16.1 ^c | 188.2 ± 12.2 ^b | 220.4 ± 7.9 ^a | 48.29 |
| | Prot (µg/mg PS) | 651.4 ± 6.4 ^a | 639.1 ± 7.5 ^b | 636.3 ± 3.6 ^b | -2.32 | 638.9 ± 4.5 ^{ab} | 633.5 ± 4.9 ^{cd} | 629.2 ± 4.1 ^e | -1.52 |
| | Carbo (µg/mg PS) | 54.9 ± 7.8 ^a | 50.8 ± 6.9 ^{ab} | 41.3 ± 7.3 ^c | -24.77 | 74.9 ± 6.5 ^a | 71.3 ± 7.1 ^{ab} | 64.5 ± 8.4 ^c | -13.84 |
| | Relación C/N | 3.9 ± 0.1 ^d | 4.3 ± 0.1 ^c | 4.5 ± 0.05 ^b | 14.32 | 4.02 ± 0.1 ^c | 4.4 ± 0.06 ^b | 4.5 ± 0.1 ^a | 12.94 |
| | Relacion Lip/Prot | 0.22 ± 0.02 ^d | 0.30 ± 0.02 ^c | 0.36 ± 0.01 ^b | 63.64 | 0.23 ± 0.02 ^c | 0.30 ± 0.02 ^b | 0.35 ± 0.01 ^a | 52.17 |
| | Energía ^s (J/mg PS) | 20.3 ± 0.3 ^d | 22.1 ± 0.3 ^c | 22.6 ± 0.2 ^b | 11.63 | 20.4 ± 0.6 ^c | 22.1 ± 0.3 ^b | 22.7 ± 0.4 ^a | 11.26 |
| | Energía ^w (J/mg PS) | 22.0 ± 0.5 ^d | 23.6 ± 0.5 ^c | 24.8 ± 0.3 ^b | 12.74 | 22.3 ± 0.7 ^c | 23.6 ± 0.5 ^b | 24.7 ± 0.3 ^a | 10.96 |
| | C (% PS) | 44.1 ± 0.7 | 48.0 ± 0.6 | 49.2 ± 0.4 | | 44.4 ± 1.3 | 48.2 ± 0.6 | 49.4 ± 0.8 | |
| | Líp (% PS) | 14.2 ± 1.2 | 19.2 ± 1.1 | 22.8 ± 0.6 | | 14.9 ± 1.6 | 18.8 ± 1.2 | 22.0 ± 0.8 | |
| 2º Período de desove | Prot (% PS) | 65.1 ± 0.6 | 63.9 ± 0.7 | 63.6 ± 0.4 | | 63.9 ± 0.4 | 63.35 ± 0.5 | 62.9 ± 0.4 | |
| | Carbo (% PS) | 5.5 ± 0.8 | 5.1 ± 0.7 | 4.1 ± 0.7 | | 7.5 ± 0.6 | 7.1 ± 0.7 | 6.5 ± 0.8 | |
| | C (µg/mg PS) | 440.8 ± 10.4 ^d | 477.4 ± 5.8 ^c | 500.2 ± 7.4 ^a | 13.47 | 441.8 ± 10.9 ^c | 480.2 ± 7.8 ^b | 499.2 ± 6.4 ^a | 12.99 |
| | Lip (µg/mg PS) | 139.0 ± 13.4 ^d | 196.1 ± 10.3 ^c | 238.4 ± 6.0 ^a | 71.51 | 142.7 ± 14.8 ^c | 190.4 ± 11.2 ^b | 227.0 ± 5.9 ^a | 59.13 |
| | Prot (µg/mg PS) | 651.3 ± 7.4 ^a | 637.9 ± 4.1 ^b | 635.4 ± 3.3 ^b | -2.44 | 639.2 ± 4.5 ^a | 635.5 ± 5.8 ^{bc} | 630.2 ± 5.1 ^{de} | -1.42 |
| | Carbo (µg/mg PS) | 47.9 ± 8.4 ^{bc} | 45.4 ± 8.6 ^{bc} | 41.4 ± 7.8 ^c | -13.47 | 67.3 ± 8.8 ^{bc} | 66.2 ± 7.6 ^{bc} | 64.7 ± 6.4 ^c | -3.86 |
| | Relación C/N | 3.9 ± 0.1 ^d | 4.3 ± 0.07 ^c | 4.55 ± 0.1 ^a | 16.37 | 4.0 ± 0.1 ^c | 4.4 ± 0.1 ^b | 4.6 ± 0.1 ^a | 14.50 |
| | Relacion Lip/Prot | 0.21 ± 0.02 ^d | 0.31 ± 0.02 ^c | 0.37 ± 0.01 ^a | 76.19 | 0.22 ± 0.02 ^c | 0.30 ± 0.02 ^b | 0.36 ± 0.01 ^a | 63.64 |
| | Energía ^s (J/mg PS) | 20.3 ± 0.5 ^d | 22.0 ± 0.3 ^c | 23.0 ± 0.3 ^a | 13.46 | 20.3 ± 0.5 ^c | 22.1 ± 0.4 ^b | 23.0 ± 0.3 ^a | 12.99 |
| | Energía ^w (J/mg PS) | 21.7 ± 0.6 ^d | 23.6 ± 0.4 ^c | 25.2 ± 0.3 ^a | 15.84 | 21.9 ± 0.6 ^c | 23.7 ± 0.5 ^b | 25.0 ± 0.3 ^a | 14.01 |
| C (% PS) | 44.08 ± 1.0 | 47.7 ± 1.0 | 50.0 ± 0.7 | | 44.2 ± 1.1 | 48.0 ± 0.8 | 49.9 ± 0.6 | | |
| Líp (% PS) | 13.9 ± 1.3 | 19.6 ± 1.0 | 23.8 ± 0.6 | | 14.3 ± 1.5 | 19.0 ± 1.1 | 22.7 ± 0.6 | | |
| Prot (% PS) | 65.13 ± 0.7 | 63.8 ± 0.4 | 63.5 ± 0.3 | | 63.9 ± 0.4 | 63.5 ± 0.6 | 63.0 ± 0.5 | | |
| Carbo (% PS) | 4.79 ± 0.8 | 4.5 ± 0.9 | 4.1 ± 0.8 | | 6.7 ± 0.9 | 6.6 ± 0.8 | 6.5 ± 0.6 | | |

Tabla 6.15. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido de carbono (C), lípidos (Lip), proteínas (Prot), carbohidratos (Carbo), relación C/N, relación lípidos/proteínas (Lip/Prot), energía^s y energía^w por mg de tejido (peso seco, PS) entre estados de maduración gonadal y entre periodos de desove en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | Ría de Arousa | | | | Ría de A Coruña | | | |
|--------------------------------|-------------------|---------------|---------|--------|---------|-----------------|---------|--------|---------|
| | | gl | MC | F | P | gl | MC | F | P |
| C (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 46 | 0.89 | 0.35 | 1 | 169 | 2.07 | 0.15 |
| | Estado desarrollo | 2 | 35964 | 702.10 | p<0.001 | 2 | 43653 | 536.10 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 338 | 6.61 | p<0.01 | 2 | 218 | 2.68 | 0.07 |
| | Error | 129 | 51 | | | 165 | 81 | | |
| Lip (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 306 | 2.96 | 0.09 | 1 | 227 | 1.54 | 0.22 |
| | Estado desarrollo | 2 | 98315 | 951.86 | p<0.001 | 2 | 86214 | 584.29 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 527 | 5.10 | p<0.01 | 2 | 575 | 3.90 | p<0.05 |
| | Error | 129 | 103 | | | 165 | 148 | | |
| Prot (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 7.70 | 0.24 | 0.62 | 1 | 84.3 | 3.59 | 0.06 |
| | Estado desarrollo | 2 | 3068 | 97.25 | p<0.001 | 2 | 1211.4 | 51.63 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 3.40 | 0.11 | 0.90 | 2 | 8.9 | 0.38 | 0.6848 |
| | Error | 129 | 31.50 | | | 165 | 23.5 | | |
| Carbo (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 525.60 | 8.61 | p<0.01 | 1 | 758 | 13.29 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 1155.50 | 18.92 | p<0.001 | 2 | 577.4 | 10.12 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 161.90 | 2.65 | 0.07 | 2 | 213.9 | 3.75 | p<0.05 |
| | Error | 129 | 61.10 | | | 165 | 57 | | |
| Relación C/N | Periodo de desove | 1 | 0.006 | 1.26 | 0.26 | 1 | 0.03 | 4.21 | p<0.05 |
| | Estado desarrollo | 2 | 4.246 | 826.06 | p<0.001 | 2 | 4.53 | 610.59 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.028 | 5.44 | p<0.01 | 2 | 0.02 | 2.45 | 0.09 |
| | Error | 129 | 0.005 | | | 165 | 0.01 | | |
| Relación Lip/Prot | Periodo de desove | 1 | 0.0010 | 3.87 | 0.05 | 1 | 0.0008 | 2.17 | 0.14 |
| | Estado desarrollo | 2 | 0.2563 | 982.51 | p<0.001 | 2 | 0.2286 | 618.43 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.0014 | 5.27 | p<0.01 | 2 | 0.00115 | 3.11 | p<0.05 |
| | Error | 129 | 0.0003 | | | 165 | 0.00037 | | |
| Energía ^s (J/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 0.10 | 0.90 | 0.34 | 1 | 0.36 | 2.07 | 0.15 |
| | Estado desarrollo | 2 | 76.12 | 702.89 | p<0.001 | 2 | 92.37 | 535.72 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.72 | 6.67 | p<0.01 | 2 | 0.47 | 2.70 | 0.07 |
| | Error | 129 | 0.11 | | | 165 | 0.17 | | |
| Energía ^w (J/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 0.05 | 0.26 | 0.61 | 1 | 0.72 | 2.65 | 0.11 |
| | Estado desarrollo | 2 | 111.95 | 523.01 | p<0.001 | 2 | 108 | 397.69 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 1.18 | 5.50 | p<0.01 | 2 | 1.49 | 5.48 | p<0.01 |
| | Error | 129 | 0.21 | | | 165 | 0.27 | | |

6.3.2.4. Composición de clases de lípidos

El contenido en las diferentes fracciones lipídicas del ovario (µg/mg PS), se obtuvieron diferencias significativas en glucolípidos (ANOVA, p<0.05) y fosfolípidos (ANOVA, p<0.01) entre los dos periodos de desove de la ría de Arousa (Tablas 6.16 y 6.17). Así, el contenido en glucolípidos presentó valores más elevados en los ovarios del primer periodo de desove, con un valor medio de 25.7 ± 6.34 µg/mg PS, mientras que el de fosfolípidos fue mayor en los ovarios del segundo periodo de desove, con un valor medio de 100.1 ± 19.40 µg/mg PS (Tabla 6.16). En cambio en la ría de A Coruña, solo se apreciaron diferencias significativas (ANOVA, p<0.001) en el contenido de glucolípidos, siendo superiores los valores de esta variable en los ovarios del primer periodo de desove, con un valor medio de 25.0 ± 5.21 µg/mg PS frente a los 22.4 ± 5.37 µg/mg PS del segundo periodo de desove (Tablas 6.16 y 6.17).

En las dos zonas geográficas dentro de cada periodo de desove se observaron tendencias similares en la composición de clases de lípidos del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS). De tal manera, que se incrementaron significativamente las tres variables a medida que avanzó el desarrollo del ovario (ANOVA, $p < 0.001$), y también con el aumento del índice gonadosomático (ANCOVA, $p < 0.001$) (Figs. 6.13 y 6.14, Tablas 6.16 y 6.17). En la ría de Arousa, los mayores aumentos de neutrolípidos y fosfolípidos se observaron entre el estado II y III, apreciándose un incremento más elevado en el primer periodo de desove (48.0%) para los neutrolípidos y en el segundo periodo de desove (41.7%) para los fosfolípidos (Tabla 6.16). En cambio, en los glucolípidos no coincide el momento de máximo incremento en los dos periodos de desove, de tal manera que en el primer periodo de desove, el mayor aumento se produjo entre el estado II y III (42.8%), mientras que en el segundo periodo se observó entre el estado III y IV (36.3%). Por otro lado, en la ría de A Coruña, entre el estado II y III se apreciaron los mayores incrementos de glucolípidos y fosfolípidos, observándose un aumento más acusado en el primer periodo de desove (36.8%) para los glucolípidos y en el segundo periodo de desove (29.9%) para los fosfolípidos (Tabla 6.16). En el caso de los neutrolípidos, al igual que sucedía en los glucolípidos en la ría de Arousa, el momento de máximo aumento no coincide en los dos periodos de desove, de esta forma en el primer periodo de desove el mayor aumento se produjo entre el estado III y IV (40.3%), mientras que en el segundo periodo se observó entre el estado II y III (43.8%). Hay que destacar que en porcentajes los fosfolípidos no sigue la misma tendencia de incrementos vista para las otras dos clases de lípidos tanto por mg de tejido como por porcentaje. En las dos rías la proporción los fosfolípidos disminuye durante el desarrollo gonadal, sobre todo al final de la maduración (estado III al IV), con un descenso más acusado en el segundo periodo de desove (9.7% en la ría de Arousa y 10% en la ría de A Coruña).

La interacción periodo de desove-estado de desarrollo en la ría de Arousa fue significativa ($p < 0.001$) para el contenido en fosfolípidos, presentando mayores valores medios los estados III ($107.7 \pm 7.87 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS) y IV ($118.0 \pm 4.28 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS) del ovario del segundo periodo de desove (Tablas 6.16 y 6.17). En cambio, en la ría de A Coruña, las diferencias significativas en la interacción se observaron en el contenido de las otras dos clases de lípidos, con mayores valores de neutrolípidos en el estado II ($45.9 \pm 4.82 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS) y de glucolípidos en el estado III ($27.1 \pm 4.24 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS) del primer periodo de desove (ANOVA, $p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente) (Tablas 6.16 y 6.17).

La relación entre el índice gonadosomático (IG) y las tres clases de lípidos fue similar en cada periodo de desove de las dos zonas de estudio (Figs. 6.13 y 6.14). Se observó una relación positiva significativa (ANCOVA, $p < 0.001$) tanto en las relaciones IG-neutrolípidos (NL) ($r^2 = 0.89$ para Arousa y $r^2 = 0.86$ para A Coruña), como IG-glucolípidos (GL) ($r^2 = 0.73$ para Arousa y $r^2 = 0.61$ para A Coruña) o IG-fosfolípidos (FL) ($r^2 = 0.80$ para Arousa y $r^2 = 0.58$ para A Coruña). El ANCOVA mostró diferencias significativas entre periodos de desove para la relación del IG con los neutrolípidos ($p < 0.001$) y con los fosfolípidos (en este caso sólo en Arousa) ($p < 0.001$), apreciándose una interacción significativa entre IG y el periodo de desove, con pendientes de 0.30 (NL) y 0.16 (FL) para el primer periodo y de 0.36 (NL) y 0.21 (FL) para el segundo periodo en Arousa y pendientes de 0.29 (NL) para el primer periodo y de 0.39 (NL) para el segundo periodo en A Coruña. En general, el incremento de neutrolípidos y de fosfolípidos (en este caso sólo en Arousa) a valores de IG comprendidos entre 0.5% y 3.0% (correspondientes con ovarios en estado II y III) fue superior en el primer periodo de desove, mientras que a valores altos de IG los incrementos de estas dos clases de lípidos fueron similares entre periodos de desove (caso de NL en Arousa) o más elevados en el segundo periodo de desove (caso de NL en A Coruña y de FL en Arousa). Por otro lado, las relaciones IG-GL e IG-FL (en este caso sólo en A Coruña) no mostraron interacción entre IG y periodo de desove, observándose que el incremento de glucolípidos del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) para un incremento dado del IG fue superior en el primer periodo de desove en las dos zonas de estudio, y la relación IG-FL (en A Coruña) mostró similares valores de incremento para un aumento dado del IG en los dos periodos de desove.

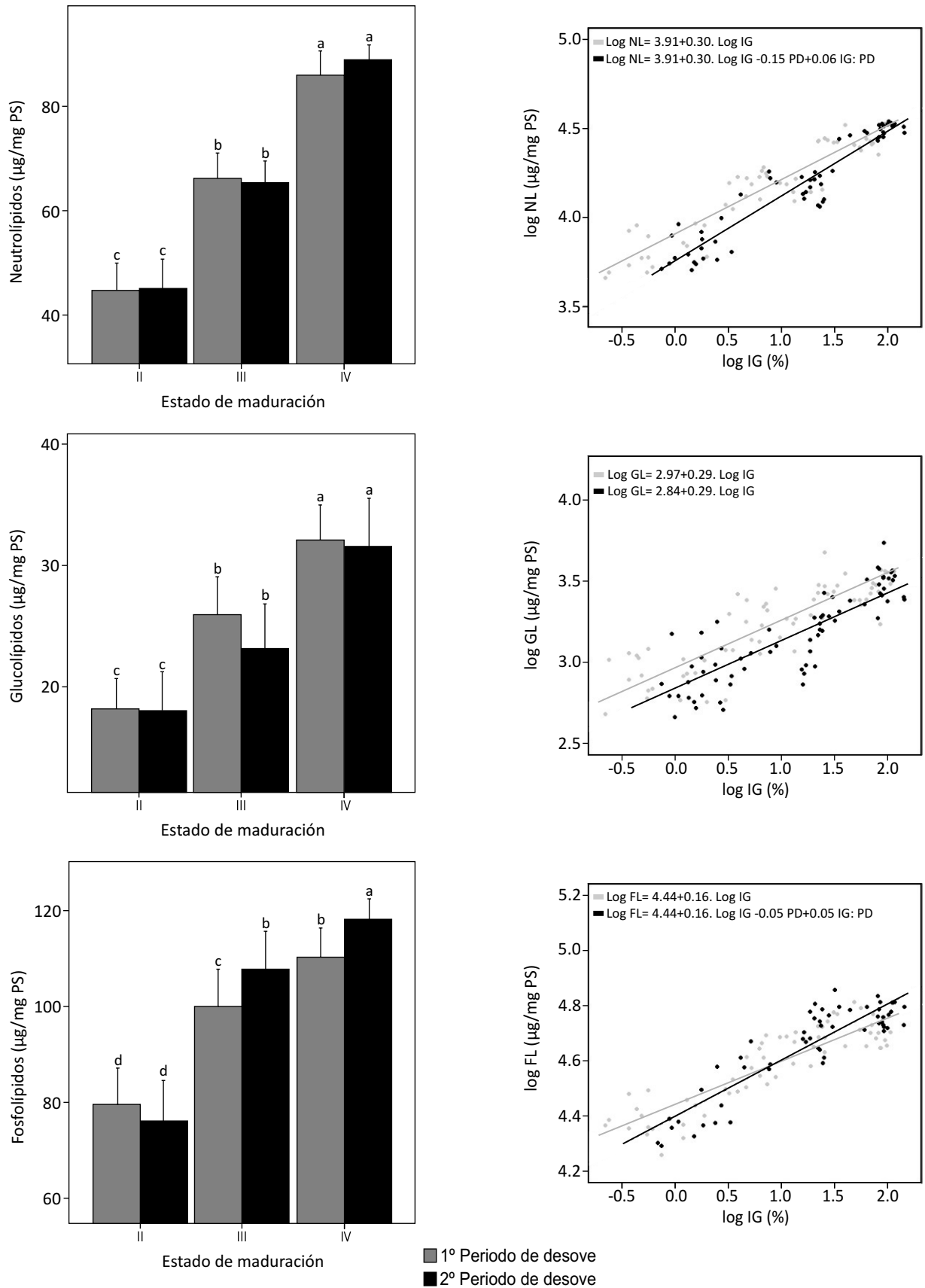


Fig. 6.13. Cambios en el contenido de neutrolípidos (NL), glucolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) por mg de tejido (pero seco, PS) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

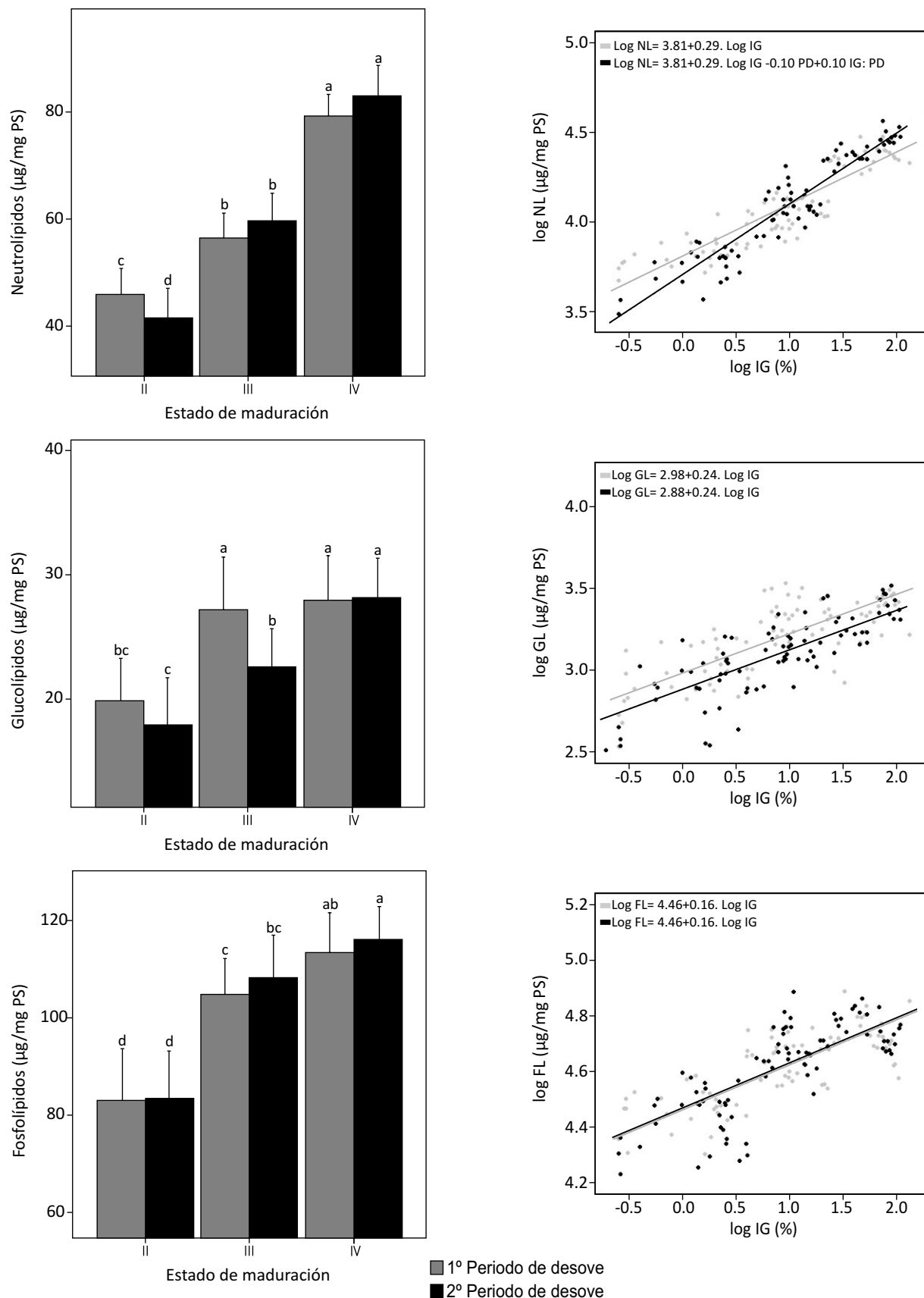


Fig. 6.14. Cambios en el contenido de neutrolípidos (NL), glucolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) por mg de tejido (pero seco, PS) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desove de *M.brachydactyla* en la ría de A Coruña. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

Tabla 6.16. Variaciones en el contenido en neutrolípidos (NL), glucolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) por mg de tejido (peso seco, PS) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado II al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal y entre periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Ría de Arousa | | | | | Ría de A Coruña | | | | |
|----------------------|----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
| Parámetros | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | |
| 1º Período de desove | NL (µg/mg PS) | 44.66 ± 5.25 ^c | 66.11 ± 4.88 ^b | 85.87 ± 4.66 ^a | 92.27 | 45.86 ± 4.82 ^c | 56.41 ± 4.62 ^b | 79.17 ± 4.03 ^a | 72.63 |
| | GL (µg/mg PS) | 18.17 ± 2.50 ^c | 25.94 ± 3.09 ^b | 32.06 ± 2.90 ^a | 76.44 | 19.85 ± 3.40 ^{bc} | 27.15 ± 4.25 ^a | 27.92 ± 3.60 ^a | 40.65 |
| | FL (µg/mg PS) | 79.50 ± 7.58 ^d | 99.88 ± 7.75 ^c | 110.15 ± 6.13 ^b | 38.55 | 82.91 ± 10.62 ^d | 104.67 ± 7.36 ^c | 113.30 ± 8.15 ^{ab} | 36.65 |
| | NL (% Lípidos) | 31.39 ± 2.41 | 34.45 ± 1.64 | 37.65 ± 1.83 | | 30.97 ± 2.41 | 29.96 ± 1.34 | 35.94 ± 1.61 | |
| | GL (% Lípidos) | 12.73 ± 1.05 | 13.50 ± 1.33 | 14.05 ± 1.16 | | 13.34 ± 1.58 | 14.41 ± 1.95 | 12.68 ± 1.66 | |
| | FL (% Lípidos) | 55.88 ± 2.79 | 52.05 ± 2.63 | 48.30 ± 2.50 | | 55.70 ± 2.49 | 55.63 ± 2.23 | 51.38 ± 2.76 | |
| 2º Período de desove | NL (µg/mg PS) | 45.01 ± 5.66 ^c | 65.30 ± 4.14 ^b | 88.83 ± 2.86 ^a | 97.36 | 41.47 ± 5.53 ^d | 59.62 ± 5.13 ^b | 82.92 ± 5.67 ^a | 99.95 |
| | GL (µg/mg PS) | 18.01 ± 3.21 ^c | 23.14 ± 3.66 ^b | 31.55 ± 3.95 ^a | 75.18 | 17.89 ± 3.81 ^c | 22.57 ± 3.05 ^b | 28.13 ± 3.18 ^a | 57.24 |
| | FL (µg/mg PS) | 76.00 ± 8.44 ^d | 107.68 ± 7.87 ^b | 118.06 ± 4.28 ^a | 55.34 | 83.30 ± 9.75 ^d | 108.17 ± 8.70 ^{bc} | 115.96 ± 6.76 ^a | 39.21 |
| | NL (% Lípidos) | 32.42 ± 3.05 | 33.31 ± 1.67 | 37.26 ± 1.06 | | 29.11 ± 2.86 | 31.33 ± 2.08 | 36.51 ± 2.00 | |
| | GL (% Lípidos) | 12.91 ± 1.53 | 11.81 ± 1.85 | 13.21 ± 1.49 | | 12.49 ± 2.07 | 11.86 ± 1.50 | 12.39 ± 1.37 | |
| | FL (% Lípidos) | 54.67 ± 2.96 | 54.87 ± 2.12 | 49.52 ± 1.61 | | 58.40 ± 3.56 | 56.81 ± 2.76 | 51.10 ± 2.99 | |

Tabla 6.17. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido en neutrolípidos (NL), glucolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) por mg de tejido (peso seco, PS) entre estados de maduración gonadal y entre periodos de desove en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Ría de Arousa | | | | | | Ría de A Coruña | | | |
|-----------------------------------|-------------------|-----|-------|--------|-------------|-----------------|--------|--------|-------------|
| Parámetros | Factor | gl | MC | F | P | gl | MC | F | P |
| NL ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | Periodo de desove | 1 | 10 | 0.45 | 0.50 | 1 | 9 | 0.37 | 0.54 |
| | Estado desarrollo | 2 | 20590 | 962.08 | $p < 0.001$ | 2 | 19692 | 785.52 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 43 | 2.01 | 0.14 | 2 | 302 | 12.04 | $p < 0.001$ |
| | Error | 129 | 21 | | | 165 | 25 | | |
| GL ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | Periodo de desove | 1 | 53.2 | 4.94 | $p < 0.05$ | 1 | 287 | 22.18 | $p < 0.001$ |
| | Estado desarrollo | 2 | 2136 | 198.44 | $p < 0.001$ | 2 | 1222.4 | 94.46 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 22.5 | 2.09 | 0.13 | 2 | 79.2 | 6.12 | $p < 0.01$ |
| | Error | 129 | 10.8 | | | 165 | 12.9 | | |
| FL ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) | Periodo de desove | 1 | 469 | 9.33 | $p < 0.01$ | 1 | 24 | 0.32 | 0.58 |
| | Estado desarrollo | 2 | 15988 | 317.83 | $p < 0.001$ | 2 | 15368 | 202.60 | $p < 0.001$ |
| | Periodo x Estado | 2 | 470 | 9.35 | $p < 0.001$ | 2 | 38 | 0.51 | 0.60 |
| | Error | 129 | 50 | | | 165 | 76 | | |

6.3.2.5. Composición de ácidos grasos

6.3.2.5.1. Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos de los ovarios de *M.brachydactyla*, tanto en la ría de Arousa como en la ría de A Coruña, presentó un total de 40 ácidos grasos pero hubo ligeras diferencias entre los dos perfiles (Anexo, Tabla 2.2). En la ría de Arousa no aparecieron los ácidos grasos saturados 23:0 y 24:0 mientras que en la ría de A Coruña, el perfil carece de los ácidos grasos poliinsaturados 20:3w3 y 22:2w6. Entre periodos de desove el perfil de cada zona geográfica se mantuvo sin cambios.

6.3.2.5.2. Composición por grupos de ácidos grasos

El contenido total de ácidos grasos del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) presentó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre periodos de desove en las dos zonas geográficas, siendo mayor en el segundo periodo de desove ($126.9 \pm 25.51 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para la ría de Arousa y $117.5 \pm 22.23 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para la ría de A Coruña) (Tablas 6.18 y 6.19). De la misma manera, dentro de cada periodo de desove se observó una tendencia similar con un aumento significativo (ANOVA, $p < 0.001$) del contenido total de ácidos grasos a lo largo de la maduración del ovario, tanto en la ría de Arousa como en la de A Coruña. Entre el estado II y III de maduración se apreció el mayor aumento, con un rango de incrementos entre el 29.1% y el 33.9% para la ría de A Coruña y entre el 34.6% y el 39.3% para la ría de Arousa. No se observó efecto de la interacción periodo de desove-estado de desarrollo en esta variable para ninguna de las zonas de estudio.

Comparando entre periodos de desove por grupo de ácidos grasos, en las dos zonas geográficas se observó la misma tendencia para los ácidos grasos monoinsaturados y los poliinsaturados, los cuales fueron significativamente (ANOVA, $p < 0.01$ para MUFA de A Coruña y $p < 0.001$ MUFA y PUFA de Arousa) más abundantes en el segundo periodo de desove (Tablas 6.18 y 6.19). En este segundo periodo de desove presentaron unos valores medios de $36.74 \pm 9.60 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para MUFA y de $55.4 \pm 7.45 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para PUFA en la ría de Arousa y de $31.5 \pm 8.91 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para MUFA y de $57.1 \pm 7.33 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para PUFA en la ría de A Coruña. Por otro lado, siguiendo un patrón opuesto, los saturados mostraron valores significativamente (ANOVA, $p < 0.05$ para Arousa y $p < 0.001$ para A Coruña) más elevados en el primer periodo de desove, con un valor medio de $33.6 \pm 7.67 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para la ría de Arousa y de $29.4 \pm 6.34 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS para la ría de A Coruña (Tablas 6.18 y 6.19).

En las dos zonas geográficas dentro de cada periodo de desove los tres grupos de ácidos grasos mostraron un incremento significativo (ANOVA, $p < 0.001$) a lo largo de la maduración del ovario (Tablas 6.18 y 6.19). En la ría de Arousa los tres grupos presentaron el aumento más acusado entre el estado II y III, con un incremento entre el 35.8% y el 45.3% para los SFA, el 47.5% y el 56.6% para los MUFA y el 25.8% y el 26.5% para los PUFA. En la ría de A Coruña, la mayor subida también se apreció al comienzo de la maduración, con un incremento entre el 36.0% y el 42.2% para los SFA, el 41.4% y el 46.8% para los MUFA y el 19.4% y el 23.7% los PUFA.

El efecto de la interacción periodo de desove-estado de desarrollo en la ría de Arousa mostró diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.01$) para los monoinsaturados y para los poliinsaturados, siendo en general mayores los valores de estas variables en cada estado de desarrollo en el segundo periodo de desove (Tablas 6.18 y 6.19). Mientras que en la ría de A Coruña, los tres grupos de ácidos grasos presentaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$ para los monoinsaturados y $p < 0.05$ para el resto). En general, los saturados presentaron mayores valores en el estado III ($30.6 \pm 2.20 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS) y IV ($36.4 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS) para el primer periodo de desove, mientras que los poliinsaturados mostraron valores más elevados para todos los estados de desarrollo en el segundo periodo de desove. En el caso de los monoinsaturados, las mayores diferencias se observaron en el estado IV, siendo más elevado ($43.1 \pm 2.90 \mu\text{g}/\text{mg}$ PS) en el segundo periodo de desove.

6.3.2.5.3. Composición de ácidos grasos individuales

A continuación, para analizar las variaciones en el contenido de ácidos grasos individuales entre periodos de desove, se seleccionaron los principales ácidos grasos presentes en los ovarios, tanto de la ría de Arousa como de la ría de A Coruña. El criterio empleado fue la proporción frente al total de ácidos grasos, tomándose solamente aquellos que se encontraban en una proporción superior al 1% en al menos uno de los estados de maduración del ovario. Los ácidos grasos seleccionados fueron: 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0 en el grupo de saturados, 16:1w7, 18:1w7 y 18:1w9 en el grupo de los monoinsaturados y 18:2w6, 18:3w6, 20:4w6, 20:5w3, 22:6w3 en el grupo de los poliinsaturados.

6.3.2.5.3.1. Ácidos grasos saturados

Entre periodos de desove en la ría de Arousa los ácidos grasos saturados 14:0, el 15:0 y el 16:0 mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$). Se observaron dos tendencias opuestas, el contenido en 14:0 y en 15:0 del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) fue mayor en el segundo periodo de desove, con valores medios de $5.0 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para el 14:0 y $1.4 \pm 0.49 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para el 15:0 mientras que el 16:0 fue más elevado en el primer periodo de desove, con un valor medio de $21.4 \pm 4.0 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (Tablas 6.18 y 6.19). En cuanto a la ría de A Coruña, se apreciaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$ para el 16:0 y $p < 0.01$ para el resto) para los ácidos grasos saturados 14:0, 16:0 y 18:0 entre periodos de desove (Tablas 6.18 y 6.19). Al igual que en Arousa, se observaron dos patrones contrarios el contenido en 14:0 del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg PS}$) fue mayor en el segundo periodo de desove ($3.4 \pm 1.15 \mu\text{g}/\text{mg PS}$) en cambio el contenido en 16:0 y 18:0 fue más elevado en el primer periodo de desove ($19.4 \pm 3.90 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para el 16:0 y $5.1 \pm 1.20 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para el 18:0).

En las dos zonas geográficas dentro de cada periodo de desove se observó un incremento significativo (ANOVA, $p < 0.001$) de los cuatro ácidos grasos saturados a medida que avanza la maduración del ovario (Tablas 6.18 y 6.19). En general, los mayores aumentos de estos ácidos grasos saturados se observaron entre el estado II y III, siendo el 15:0 el que presentó un mayor incremento en este intervalo, con un valor máximo del 92.7% y del 120.7%, que se corresponden al segundo periodo de desove de la ría de Arousa y de la ría de A Coruña, respectivamente.

La interacción periodo de desove-estado de desarrollo fue significativa para el 14:0 y 15:0 (ANOVA, $p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente) en la ría de Arousa, observándose mayores diferencias en el estado III y el estado IV, donde los valores de las dos variables fueron superiores en el segundo periodo de desove ($5.0 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (estado III) y $7.2 \pm 0.76 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (estado IV) para el 14:0 y $1.6 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (estado III) y $1.9 \pm 0.15 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ (estado IV) para el 15:0) (Tablas 6.18 y 6.19). En la ría de A Coruña, los saturados que mostraron diferencias significativas en la interacción periodo de desove-estado de desarrollo fueron el 14:0 y el 16:0 (ANOVA, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) (Tablas 6.18 y 6.19). En general, las mayores diferencias se observaron en el estado IV, donde los valores del 14:0 fueron superiores en el segundo periodo de desove ($4.7 \pm 0.73 \mu\text{g}/\text{mg PS}$) mientras que los del 16:0 fueron más elevados en el primer periodo de desove ($23.7 \pm 1.03 \mu\text{g}/\text{mg PS}$).

6.3.2.5.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados

Los ácidos grasos monoinsaturados presentaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre periodos de desove para las dos zonas geográficas (Tablas 6.18 y 6.19). Se apreció un patrón opuesto entre ellos, con valores más elevados del 16:1w7 en el primer periodo de desove ($10.6 \pm 3.21 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para Arousa y $8.8 \pm 2.43 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para A Coruña) y un contenido más elevado del 18:1w7 y el 18:1w9 en el segundo periodo de desove ($7.0 \pm 2.37 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ y $6.1 \pm 1.77 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para el 18:1w7 y $16.1 \pm 3.26 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ y $14.0 \pm 3.42 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ para el 18:1w9).

La tendencia dentro de cada periodo de desove en las dos zonas de estudio fue similar para los tres ácidos grasos, aumentando significativamente (ANOVA, $p < 0.001$) a medida que avanza la maduración del ovario (Tablas 6.18 y 6.19). En general, el mayor incremento para estos ácidos grasos se produjo entre el estado II y III de maduración. El monoinsaturado que mostró un aumento más elevado en este intervalo fue el 18:1w7, tanto en la ría de Arousa (106.7% en el segundo periodo de desove) como en la ría de A Coruña (75.5% en el primer periodo de desove). Hubo una excepción, la del 18:1w9 en la ría de A Coruña, que tuvo una mayor subida entre el estado III y IV en los dos periodos de desove, con un incremento máximo del 37.7% en el segundo periodo de desove.

El efecto de la interacción periodo de desove-estado de desarrollo fue significativo (ANOVA, $p < 0.001$ para 16:1w7 y 18:1w7 y $p < 0.01$ para el 18:1w9) para las tres variables en la ría de Arousa (Tabla 6.19). Así, el 16:1w7 mostró mayores valores en el primer periodo de desove para todos los estados de desarrollo, mientras que el 18:1w7 y el 18:1w9 presentaron los mayores valores en el segundo periodo de desove, sobre todo en los estados III y IV de desarrollo gonadal. En cambio, en la ría de A Coruña, la interacción fue significativa (ANOVA, $p < 0.001$) para el 16:1w7 y el 18:1w9, encontrándose las mayores diferencias en los estados III y IV del desarrollo (Tablas 6.18 y 6.19). Al igual que en la ría de Arousa, el 16:1w7 fue mayor en el primer periodo de desove ($9.7 \pm 0.70 \mu\text{g/mg PS}$, estado III, y $11.0 \pm 0.88 \mu\text{g/mg PS}$, estado IV) y, por el contrario, el 18:1w9 fue más elevado en el segundo periodo de desove ($13.6 \pm 0.95 \mu\text{g/mg PS}$, estado III y $18.8 \pm 1.01 \mu\text{g/mg PS}$, estado IV).

6.3.2.5.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados

En la ría de A Coruña, todos los principales ácidos grasos poliinsaturados 18:2w6, 18:3w6, 20:4w6, 20:5w3 y 22:6w3 del ovario ($\mu\text{g/mg PS}$) mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.01$ para el 22:6w3 y $p < 0.001$ para el resto) entre periodos de desove, siendo mayor su contenido en los ovarios del segundo periodo de desove, con valores medios comprendidos entre el $1.04 \pm 0.28 \mu\text{g/mg PS}$ del 18:3w6 y el $27.9 \pm 3.13 \mu\text{g/mg PS}$ del 20:5w3 (Tablas 6.18 y 6.19). En la ría de Arousa, se observó la misma tendencia significativa (ANOVA, $p < 0.001$) excepto para el 18:2w6 que en esta zona de estudio se mantuvo sin cambios entre periodos de desove (Tablas 6.18 y 6.19). El contenido del 18:3w6 fue mayor en los ovarios del primer periodo de desove ($0.9 \pm 0.22 \mu\text{g/mg PS}$), mientras que el contenido en 20:4w6, 20:5w3 y 22:6w3 fue más elevado en los ovarios del segundo periodo de desove (Tablas 6.18 y 6.19).

Tanto en la ría de Arousa como en la ría de A Coruña, se apreciaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) en los cinco ácidos grasos poliinsaturados a lo largo de la maduración dentro de cada periodo de desove (Tablas 6.18 y 6.19). Se observó un patrón contrario entre ellos, de tal manera que el 18:3w6 disminuyó mientras que el 18:2w6, el 20:4w6, el 20:5w3 y el 22:6w3 aumentaron a lo largo de la maduración del ovario. El descenso más acusado del 18:3w6 se vio entre el estado II y III del primer periodo de desove (29.7%) de la ría de Arousa y del segundo periodo de desove de la ría de A Coruña (33.8%). Para el resto de ácidos poliinsaturados, los incrementos mayores se observaron también entre el estado II y III, con valores comprendidos entre un 5.3% (20:4w6 en el primer periodo de desove) y un 52.7% (18:2w6 en el segundo periodo de desove) en la ría de Arousa y un 16.9% (20:5w3 en el segundo periodo de desove) y 41.5% (18:2w6 en el primer periodo de desove) en la ría de A Coruña.

Las diferencias significativas para la interacción periodo de desove-estado de desarrollo en la ría de Arousa se observaron en los ácidos grasos 18:2w6, 18:3w6, 20:4w6 y 22:6w3 (ANOVA, $p < 0.05$ para el 18:2w6, $p < 0.01$ para el 18:3w6 y $p < 0.001$ para el resto) (Tablas 6.18 y 6.19). En general, el 18:3w6 presentó valores más elevados en el estado II ($1.2 \pm 0.12 \mu\text{g/mg PS}$) y en el estado III ($0.8 \pm 0.05 \mu\text{g/mg PS}$) del primer periodo de desove, mientras que los otros tres ácidos grasos mostraron los valores más elevados en el segundo periodo de desove para todos los estados de desarrollo gonadal. En la ría de A Coruña, la interacción fue significativa para los ácidos grasos 18:3w6, 20:4w6 y 22:6w3 (ANOVA, $p < 0.01$

para el 20:4w6 y $p < 0.001$ para el resto). En el 20:4w6 los valores más elevados se observaron en el segundo periodo de desove para todos los estados de desarrollo, mientras que en el 22:6w3, el estado IV fue el que presentó mayores diferencias, con un valor superior ($23.2 \pm 1.94 \mu\text{g}/\text{mg PS}$) en el segundo periodo de desove. Por el contrario, en el 18:3w6 las mayores diferencias se observaron en el estado II, con valores más elevados ($1.4 \pm 0.13 \mu\text{g}/\text{mg PS}$) en el segundo periodo de desove.

6.3.2.5.3.4. Relaciones de ácidos grasos

Las relaciones, w3/w6, 20:5w3/20:4w6 y 20:5w3/22:6w3, mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) entre periodos de desove en la ría de Arousa (Tabla 6.19). Los valores más elevados de estas relaciones se vieron en el primer periodo de desove, desde el 1.27 de la relación 20:5w3/22:6w3 hasta el 7.10 de las relaciones w3/w6 y 20:5w3/20:4w6. En la ría de A Coruña, todas las relaciones mostraron diferencias significativas entre periodos de desove (ANOVA, $p < 0.01$ para la relación 20:5w3/22:6w3 y $p < 0.001$ para el resto) (Tabla 6.19). De tal manera que, las relaciones w3/w6 y 20:5w3/20:4w6 presentaron mayores valores en el primer periodo de desove, con valores medios de 7.70 y 7.80 respectivamente, mientras que las relaciones 18:1w7/18:1w9 y 20:5w3/22:6w3 fueron más elevadas en el segundo periodo de desove, con valores medios de 0.40 y 1.40, respectivamente.

En cada periodo de desove de la ría de Arousa, se observaron diferencias significativas para todas las relaciones a lo largo de la maduración del ovario (ANOVA, $p < 0.01$ para la relación 20:5w3/22:6w3 y $p < 0.001$ para el resto), excepto para la relación 20:5w3/22:6w3 en el segundo periodo de desove, que se mantuvo sin cambios. Las relaciones w3/w6, 18:1w7/18:1w9 y 20:5w3/20:4w6 se incrementaron a lo largo de la maduración, fundamentalmente entre el estado II y III, donde se han observado incrementos de hasta el 58.1% (relación 18:1w7/18:1w9). En cambio la relación 20:5w3/22:6w3 del primer periodo de desove mostró su incremento entre el estado III y IV de desarrollo, con un aumento del 11.5% (Tablas 6.18 y 6.19).

En la ría de A Coruña, las relaciones que mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) a lo largo de la maduración de cada periodo de desove fueron la relación 18:1w7/18:1w9, la 20:5w3/20:4w6 y la 20:5w3/22:6w3. Se observó una excepción para la relación 20:5w3/20:4w6 en el segundo periodo de desove donde no mostró cambios significativos. Hubo diferentes patrones de comportamiento entre las relaciones a lo largo de la maduración: la relación 18:1w7/18:1w9 primero se incrementó (estado II al III, 48.4% en el primero y 20.5% en el segundo periodo de desove) y luego descendió ligeramente (estado III al IV, 6.5% en el primero y 6.4% en el segundo periodo de desove), la relación 20:5w3/20:4w6 (solo para el primer periodo de desove) disminuyó (estado II al IV, 5.4%) y la relación 20:5w3/22:6w3 mostró un aumento, entre el estado III y IV (7%), en el primer periodo de desove y una disminución, entre el estado II y III (5.2%), en el segundo periodo de desove (Tablas 6.18 y 6.19).

Tanto en la ría de Arousa como en la ría de A Coruña, todas las relaciones presentaron una interacción significativa entre periodo de desove-estado de desarrollo (ANOVA, $p < 0.001$ y $p < 0.01$ para la relación 20:5w3/20:4w6 en la ría de A Coruña) (Tabla 6.19). En general, para las relaciones w3/w6 y 20:5w3/20:4w6, los mayores valores se observaron para todos los estados de desarrollo en el primer periodo de desove de las dos zonas de estudio. En la relación 18:1w7/18:1w9, las mayores diferencias se observaron en el estado II, siendo mayor la relación en el primer periodo (0.35 ± 0.04) en la ría de Arousa y en el segundo periodo de desove (0.39 ± 0.04) en la ría de A Coruña. Para la relación 20:5w3/22:6w3 en la ría de Arousa, las mayores diferencias se observaron en el estado IV, con valores superiores en el primer periodo de desove (7.7 ± 0.04), mientras que en la ría de A Coruña, los valores más elevados se observaron en todos los estados de desarrollo en el segundo periodo de desove.

6.3.2.5.3.5. Grado de incremento de los ácidos grasos a lo largo de la maduración

El grado de incremento de la totalidad de los ácidos grasos en la maduración del ovario fue mayor en el segundo periodo de desove tanto en la ría de Arousa (61.3%) como en la ría de A Coruña (53.4%) (Fig. 6.15). Por grupos de ácidos grasos, en la ría de Arousa el segundo periodo de desove presentó los mayores incrementos de saturados (83.7%) y poliinsaturados (36.3%), mientras que para los monoinsaturados los incrementos fueron muy parecidos en los dos periodos de desove, con un incremento del 87.7% en el primer periodo de desove y de un 86.5% en el segundo periodo de desove. En la ría de A Coruña, los saturados se incrementaron en mayor cantidad (69%) en el primer periodo de desove, los monoinsaturados (91.6%) en el segundo periodo de desove y los poliinsaturados presentaron unos incrementos muy similares en los dos periodos de desove, con un incremento del 29.0% en el primer periodo de desove y de un 31.1% en el segundo periodo de desove.

En cuanto a los ácidos grasos individuales, el 14:0, el 15:0, el 16:1w7 y el 18:1w7, fueron los ácidos grasos que mayor aumento tuvieron durante la maduración con incrementos superiores al 100% en la mayoría de los casos, tanto en la ría de Arousa como en la ría de A Coruña (Fig. 6.15). En cuanto al incremento observado en cada periodo de desove en la ría de Arousa, el 16:1w7 y el 18:1w9 mantuvieron un incremento similar (112.1% y 112.0% para el 16:1w7 y 59.8% y 59.4% para el 18:1w9) en la maduración del ovario en los dos periodos de desove, mientras que el 18:0 y el 20:5w3 se incrementaron más en el primer periodo de desove (diferencia de los incrementos entre periodos de un 4.9% para el 18:0 y un 4.0% para el 20:5w3).

El resto de ácidos grasos individuales presentaron un incremento mayor en la maduración del ovario en el segundo periodo de desove, con unas diferencias con el primer periodo de desove entre un 9.2% para el 16:0 y un 32.5% para el 14:0 (Fig. 6.15). Por otro lado, en la ría de A Coruña el 15:0 fue el único ácido graso que se mantuvo con un incremento similar (156.4% en el primer periodo y 155.2% en el segundo periodo de desove) en la maduración del ovario entre periodos de desove. En el resto de ácidos grasos se observaron diferencias de incrementos entre periodos de desove, con dos tendencias diferenciadas. El 14:0, el 16:1w7, 18:1w9 y 22:6w3, presentaron mayor incremento en la maduración del ovario del segundo periodo de desove, con unas diferencias con el primer periodo de desove que oscilaron entre un 12.6% para el 18:1w9 hasta un 26.1% para el 14:0. El resto de ácidos grasos mostraron un mayor incremento en la maduración del ovario en el primer periodo de desove, con unas diferencias con el segundo periodo de desove que oscilaron entre un 3.0% para el 20:5w3 hasta un 26.9% para el 18:2w6.

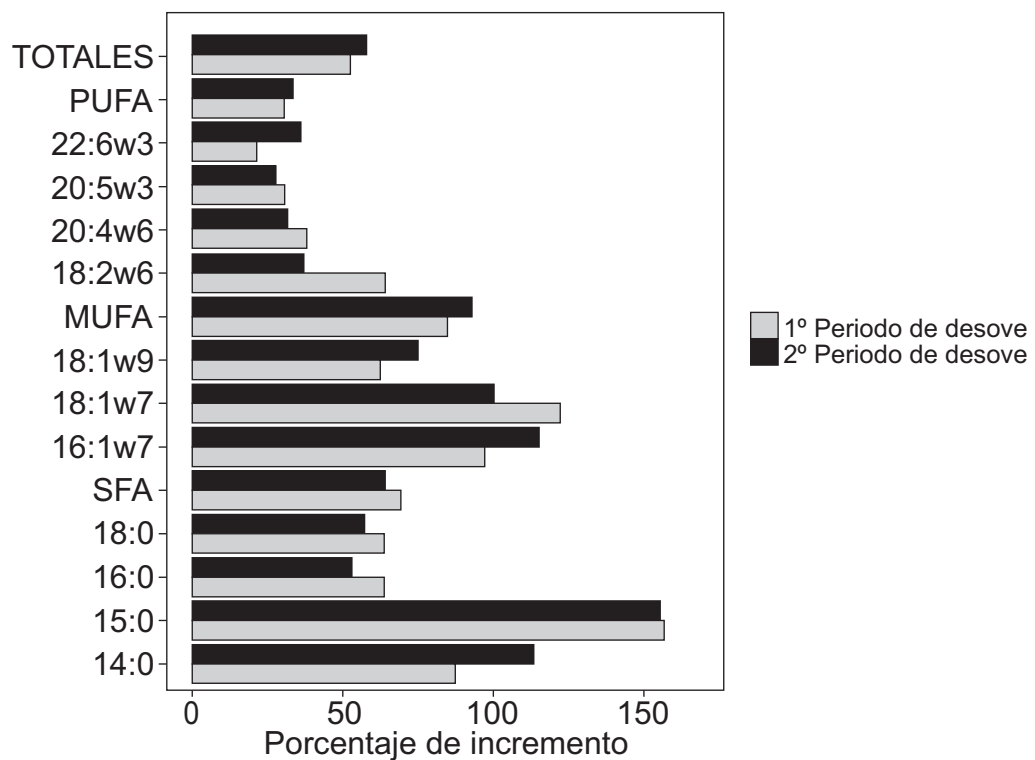
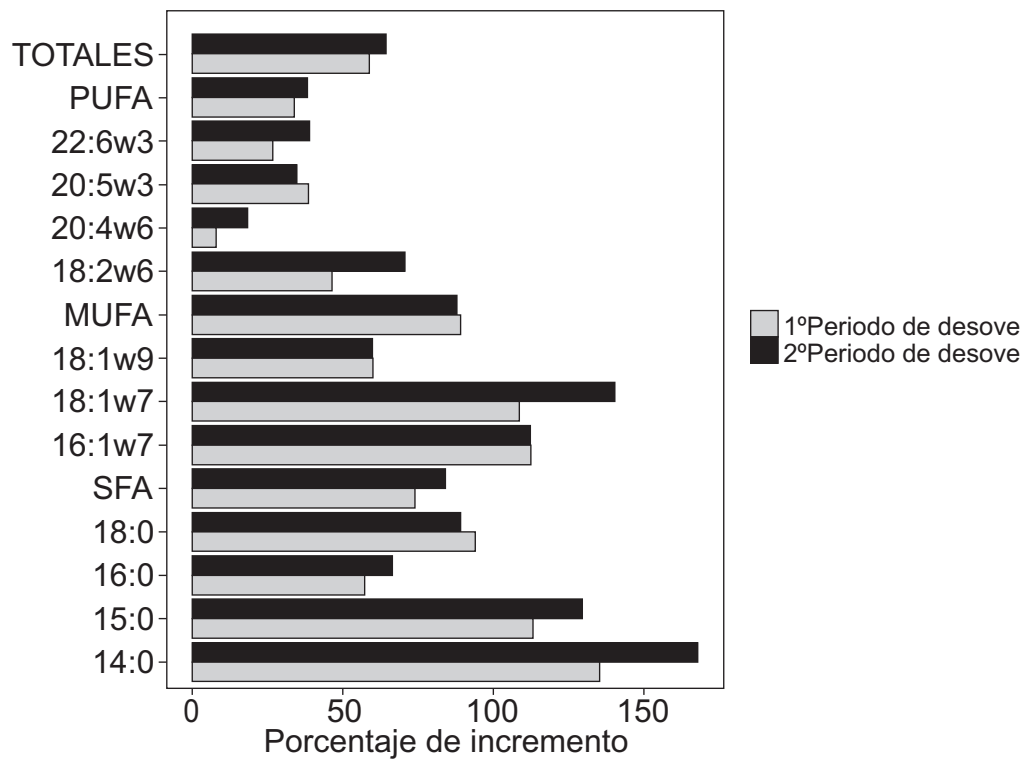


Fig. 6.15. Grado de incremento de los ácidos grasos a lo largo de la maduración del ovario de *M. brachydactyla* en los dos periodos de desove en la ría de Arousa (arriba) y en la ría de A Coruña (abajo).

Tabla 6.18. Variaciones del contenido en los principales ácidos grasos por mg de tejido (peso seco, PS) junto con su incremento (%) desde el estado II al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal y entre periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| | Ría de Arousa | | | | Ría de A Coruña | | | | |
|----------------------|----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
| | Parámetros | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento |
| 1º Periodo de desove | 14.0 | 2.71 ± 0.40 ^e | 3.93 ± 0.37 ^d | 6.37 ± 0.84 ^b | 135.06 | 2.17 ± 0.30 ^d | 3.36 ± 0.38 ^c | 4.06 ± 0.50 ^b | 87.10 |
| | 15.0 | 0.78 ± 0.19 ^d | 1.38 ± 0.08 ^c | 1.66 ± 0.16 ^b | 112.82 | 0.55 ± 0.12 ^c | 1.19 ± 0.17 ^b | 1.41 ± 0.12 ^a | 156.36 |
| | 16.0 | 16.38 ± 0.78 ^e | 21.62 ± 1.30 ^c | 25.71 ± 1.62 ^a | 56.96 | 14.49 ± 1.24 ^d | 20.20 ± 1.26 ^b | 23.70 ± 1.03 ^a | 63.56 |
| | 18.0 | 3.83 ± 0.52 ^c | 5.33 ± 0.56 ^b | 7.42 ± 0.84 ^a | 93.73 | 3.89 ± 0.56 ^c | 5.22 ± 0.68 ^b | 6.36 ± 0.70 ^a | 63.50 |
| | Σ SFA | 24.30 ± 1.27 ^c | 33.00 ± 1.96 ^b | 42.18 ± 3.24 ^a | 73.58 | 21.53 ± 1.83 ^e | 30.62 ± 2.19 ^c | 36.38 ± 1.97 ^a | 68.97 |
| | 16:1w7 | 6.70 ± 1.04 ^e | 10.54 ± 0.83 ^c | 14.21 ± 0.96 ^a | 112.09 | 5.61 ± 0.91 ^d | 9.70 ± 0.70 ^b | 11.04 ± 0.88 ^a | 96.79 |
| | 18:1w7 | 3.61 ± 0.59 ^d | 6.05 ± 0.64 ^c | 7.52 ± 0.54 ^b | 108.31 | 3.19 ± 0.57 ^f | 5.60 ± 0.54 ^d | 7.08 ± 0.44 ^b | 121.94 |
| | 18:1w9 | 10.22 ± 0.63 ^d | 12.91 ± 0.72 ^c | 16.32 ± 0.79 ^b | 59.69 | 10.09 ± 0.68 ^e | 12.12 ± 1.12 ^d | 16.36 ± 1.08 ^b | 62.14 |
| | Σ MUFA | 22.87 ± 1.58 ^e | 33.69 ± 2.32 ^d | 42.87 ± 2.50 ^b | 87.45 | 21.35 ± 2.28 ^d | 31.34 ± 2.51 ^c | 38.96 ± 2.61 ^b | 82.48 |
| | 18:2w6 | 1.00 ± 0.14 ^d | 1.29 ± 0.19 ^c | 1.46 ± 0.18 ^{ab} | 46.00 | 0.94 ± 0.19 ^e | 1.33 ± 0.32 ^{cd} | 1.54 ± 0.23 ^{ab} | 63.83 |
| | 18:3w6 | 1.18 ± 0.12 ^a | 0.83 ± 0.05 ^c | 0.70 ± 0.05 ^{de} | -40.68 | 1.13 ± 0.04 ^b | 0.87 ± 0.12 ^{cd} | 0.81 ± 0.04 ^{de} | -28.32 |
| | 20:4w6 | 3.19 ± 0.12 ^e | 3.36 ± 0.05 ^d | 3.44 ± 0.12 ^d | 7.84 | 2.70 ± 0.22 ^d | 3.72 ± 0.24 ^c | 3.72 ± 0.26 ^c | 37.78 |
| | 20:5w3 | 19.16 ± 2.06 ^e | 24.89 ± 0.89 ^c | 26.50 ± 1.36 ^b | 38.31 | 22.18 ± 1.06 ^e | 27.03 ± 1.15 ^c | 28.95 ± 1.69 ^b | 30.52 |
| | 22:6w3 | 15.53 ± 1.02 ^e | 20.37 ± 0.86 ^c | 19.64 ± 1.42 ^c | 26.46 | 16.62 ± 1.54 ^c | 21.00 ± 1.65 ^b | 20.14 ± 1.70 ^b | 21.18 |
| | Σ PUFA | 42.07 ± 3.05 ^e | 53.21 ± 2.10 ^c | 55.30 ± 2.30 ^c | 31.45 | 45.35 ± 3.01 ^e | 55.93 ± 3.39 ^c | 58.27 ± 3.56 ^{bc} | 28.49 |
| | Σ TOTALES | 91.16 ± 4.97 ^e | 122.68 ± 6.04 ^d | 142.88 ± 7.74 ^b | 56.74 | 90.17 ± 6.99 ^d | 120.71 ± 7.96 ^c | 136.16 ± 7.91 ^b | 51.00 |
| | w3/w6 | 6.13 ± 0.41 ^c | 7.66 ± 0.23 ^a | 7.42 ± 0.38 ^a | 21.04 | 7.84 ± 0.29 ^a | 7.77 ± 0.52 ^a | 7.54 ± 0.28 ^a | |
| | 18:1w7/C18:1w9 | 0.35 ± 0.04 ^c | 0.47 ± 0.03 ^{ab} | 0.46 ± 0.01 ^b | 31.43 | 0.31 ± 0.04 ^d | 0.46 ± 0.02 ^a | 0.43 ± 0.01 ^b | 38.71 |
| | 20:5w3/C22:6w3 | 1.23 ± 0.09 ^b | 1.22 ± 0.04 ^b | 1.36 ± 0.12 ^a | 10.57 | 1.34 ± 0.07 ^{cd} | 1.29 ± 0.06 ^d | 1.44 ± 0.10 ^{ab} | 7.46 |
| | 20:5w3/C20:4w6 | 6.00 ± 0.62 ^b | 7.42 ± 0.20 ^a | 7.70 ± 0.45 ^a | 28.33 | 8.25 ± 0.37 ^a | 7.29 ± 0.22 ^c | 7.80 ± 0.38 ^b | -5.45 |
| 2º Periodo de desove | 14.0 | 2.71 ± 0.58 ^e | 5.00 ± 0.35 ^c | 7.25 ± 0.76 ^a | 167.53 | 2.20 ± 0.30 ^d | 3.62 ± 0.46 ^c | 4.69 ± 0.73 ^a | 113.18 |
| | 15.0 | 0.82 ± 0.23 ^d | 1.59 ± 0.11 ^b | 1.88 ± 0.16 ^a | 129.27 | 0.58 ± 0.12 ^c | 1.28 ± 0.16 ^b | 1.48 ± 0.15 ^a | 155.17 |
| | 16.0 | 14.49 ± 0.95 ^f | 20.17 ± 1.18 ^d | 24.08 ± 1.37 ^b | 66.18 | 13.68 ± 0.89 ^d | 17.66 ± 1.33 ^c | 20.91 ± 1.23 ^b | 52.85 |
| | 18.0 | 3.85 ± 0.95 ^c | 5.14 ± 0.48 ^b | 7.27 ± 0.76 ^a | 88.83 | 3.84 ± 0.58 ^c | 5.01 ± 0.75 ^b | 6.03 ± 0.53 ^a | 57.03 |
| | Σ SFA | 22.61 ± 2.20 ^c | 32.86 ± 1.70 ^b | 41.54 ± 2.89 ^a | 83.72 | 20.70 ± 1.60 ^e | 28.15 ± 2.00 ^d | 33.91 ± 2.42 ^b | 63.82 |
| | 16:1w7 | 5.35 ± 0.98 ^f | 9.44 ± 0.82 ^d | 11.34 ± 0.70 ^b | 111.96 | 4.70 ± 1.20 ^e | 7.13 ± 0.91 ^c | 10.09 ± 1.02 ^b | 114.89 |
| | 18:1w7 | 3.79 ± 0.74 ^d | 7.83 ± 0.59 ^b | 9.10 ± 0.58 ^a | 140.11 | 4.15 ± 0.43 ^e | 6.38 ± 0.52 ^c | 8.30 ± 0.48 ^a | 100.00 |
| | 18:1w9 | 12.35 ± 1.31 ^c | 15.93 ± 1.28 ^b | 19.69 ± 0.72 ^a | 59.43 | 10.75 ± 0.77 ^e | 13.64 ± 0.95 ^c | 18.78 ± 1.01 ^a | 74.70 |
| | Σ MUFA | 24.71 ± 3.26 ^e | 38.69 ± 3.07 ^c | 46.09 ± 2.28 ^a | 86.52 | 22.48 ± 2.60 ^d | 31.79 ± 2.60 ^c | 43.07 ± 2.89 ^a | 91.59 |
| | 18:2w6 | 0.91 ± 0.11 ^d | 1.39 ± 0.13 ^{bc} | 1.55 ± 0.21 ^a | 70.33 | 1.22 ± 0.21 ^d | 1.43 ± 0.15 ^{bc} | 1.67 ± 0.27 ^a | 36.89 |
| | 18:3w6 | 1.01 ± 0.15 ^b | 0.75 ± 0.05 ^d | 0.64 ± 0.04 ^e | -36.63 | 1.36 ± 0.13 ^a | 0.90 ± 0.03 ^c | 0.76 ± 0.04 ^e | -44.12 |
| | 20:4w6 | 4.26 ± 0.13 ^c | 4.73 ± 0.15 ^b | 5.03 ± 0.16 ^a | 18.08 | 3.81 ± 0.48 ^c | 4.62 ± 0.12 ^b | 5.01 ± 0.29 ^a | 31.50 |
| | 20:5w3 | 20.85 ± 1.31 ^d | 26.37 ± 0.59 ^b | 28.01 ± 1.00 ^a | 34.34 | 24.59 ± 1.24 ^d | 28.74 ± 1.45 ^b | 31.35 ± 1.45 ^a | 27.49 |
| | 22:6w3 | 16.94 ± 0.95 ^d | 21.56 ± 1.31 ^b | 23.49 ± 1.51 ^a | 38.67 | 17.09 ± 1.94 ^c | 21.00 ± 1.89 ^b | 23.23 ± 1.94 ^a | 35.93 |
| | Σ PUFA | 45.75 ± 2.50 ^d | 57.57 ± 2.43 ^b | 62.34 ± 2.27 ^a | 36.26 | 49.49 ± 3.27 ^d | 59.09 ± 3.61 ^b | 64.89 ± 3.77 ^a | 31.12 |
| | Σ TOTALES | 94.52 ± 7.53 ^e | 131.66 ± 6.96 ^c | 152.42 ± 6.98 ^a | 61.26 | 94.04 ± 7.16 ^d | 121.45 ± 7.95 ^c | 144.22 ± 8.86 ^a | 53.36 |
| | w3/w6 | 5.81 ± 0.32 ^d | 6.53 ± 0.18 ^b | 6.59 ± 0.30 ^b | 13.43 | 6.39 ± 0.70 ^c | 6.84 ± 0.21 ^b | 6.91 ± 0.29 ^b | 8.14 |
| | 18:1w7/C18:1w9 | 0.31 ± 0.05 ^d | 0.49 ± 0.01 ^a | 0.46 ± 0.01 ^b | 48.39 | 0.39 ± 0.02 ^c | 0.47 ± 0.01 ^a | 0.44 ± 0.01 ^b | 12.82 |
| | 20:5w3/C22:6w3 | 1.23 ± 0.05 ^b | 1.23 ± 0.06 ^b | 1.20 ± 0.09 ^b | | 1.45 ± 0.16 ^a | 1.37 ± 0.06 ^{bc} | 1.35 ± 0.08 ^{cd} | -6.90 |
| | 20:5w3/C20:4w6 | 4.89 ± 0.23 ^d | 5.58 ± 0.11 ^c | 5.58 ± 0.30 ^c | 14.11 | 6.56 ± 0.92 ^d | 6.22 ± 0.19 ^d | 6.26 ± 0.27 ^d | -4.57 |

Tabla 6.19. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido de ácidos grasos por mg de tejido (peso seco, PS) entre estados de maduración gonadal y entre periodos de desove en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | Ría de Arousa | | | | Ría de A Coruña | | | |
|-------------------|-------------------|---------------|---------|--------|---------|-----------------|---------|--------|---------|
| | | gl | MC | F | P | gl | MC | F | P |
| 14:0 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 13.54 | 38.50 | p<0.001 | 1 | 1.75 | 8.39 | p<0.01 |
| | Estado desarrollo | 2 | 195.56 | 556.00 | p<0.001 | 2 | 68.78 | 330.62 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 3.55 | 10.10 | p<0.001 | 2 | 1.25 | 5.99 | p<0.01 |
| | Error | 129 | 0.35 | | | 165 | 0.21 | | |
| 15:0 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 0.69 | 26.57 | p<0.001 | 1 | 0.019 | 0.96 | 0.33 |
| | Estado desarrollo | 2 | 11.13 | 428.21 | p<0.001 | 2 | 12.246 | 601.66 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.12 | 4.53 | p<0.05 | 2 | 0.012 | 0.61 | 0.55 |
| | Error | 129 | 0.03 | | | 165 | 0.02 | | |
| 16:0 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 103.80 | 67.60 | p<0.001 | 1 | 228.60 | 167.30 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 1019.80 | 663.90 | p<0.001 | 2 | 948.90 | 694.60 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.50 | 0.35 | 0.71 | 2 | 16.80 | 12.30 | p<0.001 |
| | Error | 129 | 1.50 | | | 165 | 1.40 | | |
| 18:0 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 0.59 | 1.15 | 0.29 | 1 | 3.09 | 7.57 | p<0.01 |
| | Estado desarrollo | 2 | 141.78 | 276.66 | p<0.001 | 2 | 75.65 | 185.50 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.13 | 0.25 | 0.78 | 2 | 0.28 | 0.69 | 0.50 |
| | Error | 129 | 0.51 | | | 165 | 0.41 | | |
| SFA (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 32.00 | 5.86 | p<0.05 | 1 | 249.60 | 62.31 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 3854.00 | 699.80 | p<0.001 | 2 | 2782.20 | 694.66 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 7.00 | 1.22 | 0.30 | 2 | 13.20 | 3.29 | p<0.05 |
| | Error | 129 | 6.00 | | | 165 | 4.00 | | |
| 16:1w7 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 118.70 | 149.37 | p<0.001 | 1 | 123.90 | 137.24 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 513.20 | 645.73 | p<0.001 | 2 | 414.40 | 459.10 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 10.60 | 13.34 | p<0.001 | 2 | 13.10 | 14.51 | p<0.001 |
| | Error | 129 | 0.80 | | | 165 | 0.90 | | |
| 18:1w7 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 43.60 | 114.87 | p<0.001 | 1 | 29.10 | 116.44 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 254.86 | 671.47 | p<0.001 | 2 | 228.44 | 914.16 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 8.26 | 21.76 | p<0.001 | 2 | 0.66 | 2.62 | 0.08 |
| | Error | 129 | 0.38 | | | 165 | 0.25 | | |
| 18:1w9 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 266.50 | 295.01 | p<0.001 | 1 | 69.70 | 78.12 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 520.00 | 575.62 | p<0.001 | 2 | 726.00 | 813.54 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 4.50 | 5.04 | p<0.01 | 2 | 10.80 | 12.14 | p<0.001 |
| | Error | 129 | 0.90 | | | 165 | 0.90 | | |
| MUFA (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 381.44 | 57.58 | p<0.001 | 1 | 152.40 | 22.89 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 4877.05 | 736.17 | p<0.001 | 2 | 5064.10 | 760.44 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 26.74 | 4.04 | p<0.01 | 2 | 50.80 | 7.63 | p<0.001 |
| | Error | 129 | 6.62 | | | 165 | 6.70 | | |
| 18:2w6 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 0.02 | 0.81 | 0.37 | 1 | 1.021 | 18.36 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 3.65 | 136.80 | p<0.001 | 2 | 3.798 | 68.27 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.12 | 4.55 | p<0.05 | 2 | 0.138 | 2.49 | 0.09 |
| | Error | 129 | 0.03 | | | 165 | 0.056 | | |

Tabla 6.19. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido de ácidos grasos por mg de tejido (peso seco, PS) entre estados de maduración gonadal y entre periodos de desove en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P (continuación).

| Parámetros | Factor | Ría de Arousa | | | | Ría de A Coruña | | | |
|--------------------|-------------------|---------------|----------|---------|---------|-----------------|----------|--------|---------|
| | | gl | MC | F | P | gl | MC | F | P |
| 18:3w6 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 0.39 | 51.38 | p<0.001 | 1 | 0.201 | 27.21 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 2.13 | 281.15 | p<0.001 | 2 | 3.3328 | 451.14 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.04 | 4.95 | p<0.01 | 2 | 0.3093 | 41.86 | p<0.001 |
| | Error | 129 | 0.01 | | | 165 | 0.0074 | | |
| 20:4w6 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 60.88 | 3752.18 | p<0.001 | 1 | 46.32 | 521.18 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 3.16 | 194.86 | p<0.001 | 2 | 20.33 | 228.70 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.78 | 47.83 | p<0.001 | 2 | 0.54 | 6.08 | p<0.01 |
| | Error | 129 | 0.02 | | | 165 | 0.09 | | |
| 20:5w3 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 70.50 | 43.99 | p<0.001 | 1 | 152.20 | 84.17 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 642.50 | 400.86 | p<0.001 | 2 | 669.50 | 370.34 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.10 | 0.09 | 0.92 | 2 | 2.30 | 1.29 | 0.28 |
| | Error | 129 | 1.60 | | | 165 | 1.80 | | |
| 22:6w3 (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 150.20 | 101.59 | p<0.001 | 1 | 31.40 | 9.84 | p<0.01 |
| | Estado desarrollo | 2 | 384.00 | 259.81 | p<0.001 | 2 | 400.30 | 125.59 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 25.30 | 17.14 | p<0.001 | 2 | 37.20 | 11.69 | p<0.001 |
| | Error | 129 | 1.50 | | | 165 | 3.20 | | |
| PUFA (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 850.10 | 142.00 | p<0.001 | 1 | 928.00 | 78.93 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 2704.50 | 451.76 | p<0.001 | 2 | 3056.00 | 259.90 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 36.30 | 6.07 | p<0.01 | 2 | 42.00 | 3.58 | p<0.05 |
| | Error | 129 | 6.00 | | | 165 | 12.00 | | |
| Totales (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 1786.30 | 38.50 | p<0.001 | 1 | 756.00 | 12.00 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 34382.50 | 740.70 | p<0.001 | 2 | 32955.00 | 543.00 | p<0.01 |
| | Periodo x Estado | 2 | 128.80 | 2.80 | 0.07 | 2 | 184.00 | 3.00 | 0.05 |
| | Error | 129 | 46.40 | | | 165 | 61.00 | | |
| w3/w6 | Periodo de desove | 1 | 19.55 | 198.43 | p<0.001 | 1 | 42.72 | 224.83 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 17.11 | 173.66 | p<0.001 | 2 | 0.53 | 2.80 | 0.06 |
| | Periodo x Estado | 2 | 1.79 | 18.20 | p<0.001 | 2 | 2.50 | 13.14 | p<0.001 |
| | Error | 129 | 0.10 | | | 165 | 0.19 | | |
| 18:1w7/18:1w9 | Periodo de desove | 1 | 0.00 | 2.71 | 0.10 | 1 | 0.03 | 61.01 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 0.30 | 317.43 | p<0.001 | 2 | 0.21 | 505.02 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.01 | 13.64 | p<0.001 | 2 | 0.02 | 54.00 | p<0.001 |
| | Error | 129 | 0.00 | | | 165 | 0.00 | | |
| 20:5w3/22:6w3 | Periodo de desove | 1 | 0.10 | 16.24 | p<0.001 | 1 | 0.08 | 9.28 | p<0.01 |
| | Estado desarrollo | 2 | 0.03 | 5.22 | p<0.01 | 2 | 0.09 | 9.99 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.10 | 15.98 | p<0.001 | 2 | 0.16 | 17.61 | p<0.001 |
| | Error | 129 | 0.01 | | | 165 | 0.01 | | |
| 20:5w3/20:4w6 | Periodo de desove | 1 | 100.66 | 802.66 | p<0.001 | 1 | 83.57 | 357.43 | p<0.001 |
| | Estado desarrollo | 2 | 17.94 | 143.03 | p<0.001 | 2 | 6.30 | 26.95 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 3.09 | 24.65 | p<0.001 | 2 | 1.54 | 6.59 | p<0.01 |
| | Error | 129 | 0.13 | | | 165 | 0.23 | | |

6.3.2.6. Composición de ácidos nucleicos

El contenido en ácidos nucleicos (ADN y ARN) del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) y la relación ARN/ADN, no mostraron diferencias significativas entre periodos de desove, tanto para la ría de Arousa como para la ría de A Coruña (Tablas 6.20 y 6.21).

En cada periodo de desove de las dos zonas geográficas, los ácidos nucleicos presentaron diferencias significativas a lo largo de la maduración gonadal (ANOVA, $p < 0.001$) y con el incremento del índice gonadosomático (ANCOVA, $p < 0.001$). El contenido en ADN y en ARN del ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) mostraron una disminución progresiva durante la maduración, con valores de descenso similares entre periodos de desove, tanto en la ría de Arousa (87.8% y 87.2% para ADN y 73.1% y 71.6% para ARN en el primer y segundo periodo de desove, respectivamente) como en la ría de A Coruña (87.9% y 88.9% para ADN y 71.1% y 71.6% para ARN en el primer y segundo periodo de desove, respectivamente) (Figs. 6.16 y 6.17, Tablas 6.20 y 6.21). Cabe destacar también la semejanza en los valores de descenso de los ácidos nucleicos en las dos rías. Por otro lado, la relación ARN/ADN se incrementó considerablemente a lo largo de la madurez, observándose un patrón diferente entre periodos de desove en las dos rías. Así, en la ría de Arousa los mayores incrementos de esta relación se observaron en el primer periodo de desove (126.6%) mientras que en la ría de A Coruña, los incrementos más elevados se mostraron en el segundo periodo de desove (154.8%). No se observó efecto significativo de la interacción periodo de desove-estado de desarrollo en ninguna de las variables en las dos zonas geográficas.

Tabla 6.20. Variaciones en el contenido en ADN, ARN y relación ARN/ADN por mg de tejido (peso seco, PS) y por porcentaje junto con su incremento (%) desde el estado II al IV (si es significativo) del desarrollo gonadal y entre periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa y en la ría de A Coruña. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras superíndice dentro de cada variable representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$).

| Ría de Arousa | | | | | | Ría de A Coruña | | | |
|----------------------|------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|
| Parámetros | | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento | Estado II | Estado III | Estado IV | % Incremento |
| 1º Periodo de desove | ADN (µg/mg PS) | 2.38 ± 0.63 ^a | 0.80 ± 0.22 ^b | 0.29 ± 0.07 ^c | -87.82 | 2.31 ± 0.77 ^a | 0.82 ± 0.19 ^b | 0.28 ± 0.07 ^c | -87.88 |
| | ARN (µg/mg PS) | 10.41 ± 2.24 ^a | 5.56 ± 1.32 ^b | 2.80 ± 0.42 ^c | -73.10 | 10.33 ± 2.62 ^a | 5.46 ± 1.12 ^b | 2.99 ± 0.58 ^c | -71.06 |
| | Relación ARN/ADN | 4.48 ± 0.62 ^c | 7.04 ± 0.70 ^b | 10.15 ± 1.60 ^a | 126.56 | 4.61 ± 0.48 ^c | 6.70 ± 0.68 ^b | 10.79 ± 2.00 ^a | 134.06 |
| | ADN (% PS) | 0.24 ± 0.06 | 0.08 ± 0.02 | 0.03 ± 0.01 | | 0.23 ± 0.08 | 0.08 ± 0.02 | 0.03 ± 0.01 | |
| | ARN (% PS) | 1.04 ± 0.22 | 0.56 ± 0.13 | 0.28 ± 0.04 | | 1.03 ± 0.26 | 0.55 ± 0.11 | 0.30 ± 0.06 | |
| 2º Periodo de desove | ADN (µg/mg PS) | 2.26 ± 0.75 ^a | 0.74 ± 0.14 ^b | 0.29 ± 0.08 ^c | -87.17 | 2.34 ± 0.70 ^a | 0.77 ± 0.23 ^b | 0.26 ± 0.06 ^c | -88.89 |
| | ARN (µg/mg PS) | 10.47 ± 2.61 ^a | 5.30 ± 1.24 ^b | 2.97 ± 0.64 ^c | -71.63 | 10.35 ± 2.47 ^a | 5.26 ± 1.17 ^b | 2.94 ± 0.51 ^c | -71.59 |
| | Relación ARN/ADN | 4.78 ± 0.58 ^c | 7.12 ± 0.67 ^b | 10.64 ± 1.93 ^a | 122.59 | 4.54 ± 0.51 ^c | 7.12 ± 1.18 ^b | 11.57 ± 1.99 ^a | 154.85 |
| | ADN (% PS) | 0.23 ± 0.08 | 0.07 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 | | 0.23 ± 0.07 | 0.08 ± 0.02 | 0.03 ± 0.01 | |
| | ARN (% PS) | 1.05 ± 0.26 | 0.53 ± 0.12 | 0.30 ± 0.06 | | 1.03 ± 0.25 | 0.53 ± 0.12 | 0.29 ± 0.05 | |

La relación entre el índice gonadosomático (IG) y los ácidos nucleicos (AND, ARN y la relación ARN/ADN) fue similar en cada periodo de desove de las dos zonas de estudio (Figs. 6.16 y 6.17), observándose una relación negativa significativa para el ADN ($r^2 = 0.96$ para Arousa y $r^2 = 0.94$ para A Coruña, $p < 0.001$) y para el ARN ($r^2 = 0.92$ para Arousa y $r^2 = 0.94$ para A Coruña, $p < 0.001$) por el contrario, una relación positiva significativa para la relación ARN/ADN ($r^2 = 0.85$ para Arousa y $r^2 = 0.85$ para A Coruña, $p < 0.001$). Entre periodos de desove, el ANCOVA mostró la inexistencia de interacción significativa entre IG y periodo de desove para las tres variables de las dos zonas geográficas. Se observaron mayores valores de ADN y ARN para un incremento dado del IG en el segundo periodo de desove, tanto en la ría de Arousa como en la ría de A Coruña. En cuanto a la relación ARN/ADN, mientras que en A Coruña la relación mostró valores similares en los dos periodos, en la ría de Arousa se obtuvieron valores más elevados en el primer periodo de desove para un incremento dado del IG.

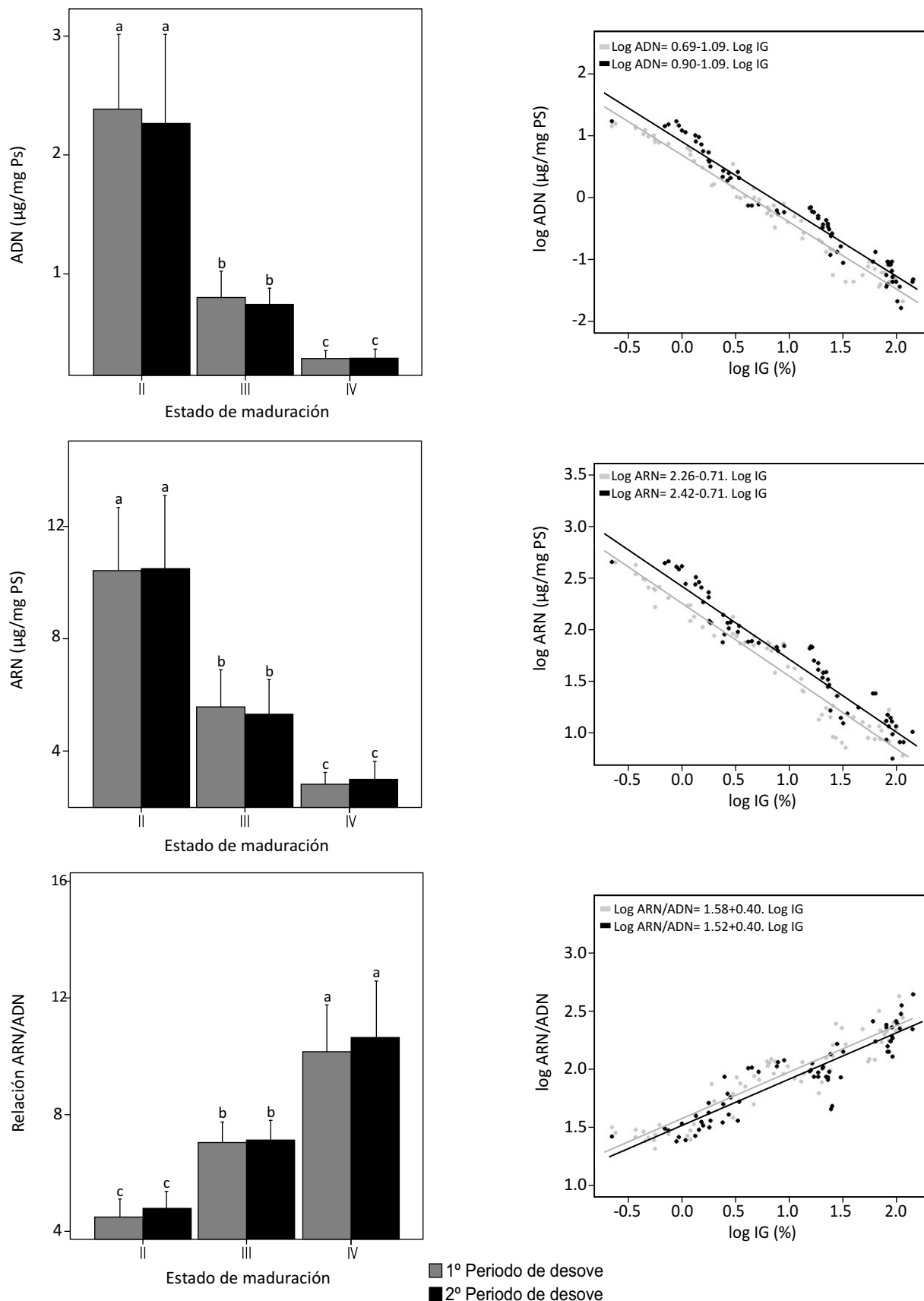


Fig. 6.16. Cambios en el contenido de AND, ARN y de la relación ARN/ADN por mg de tejido (pero seco, PS) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosómico (derecha) de los dos periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de Arousa. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

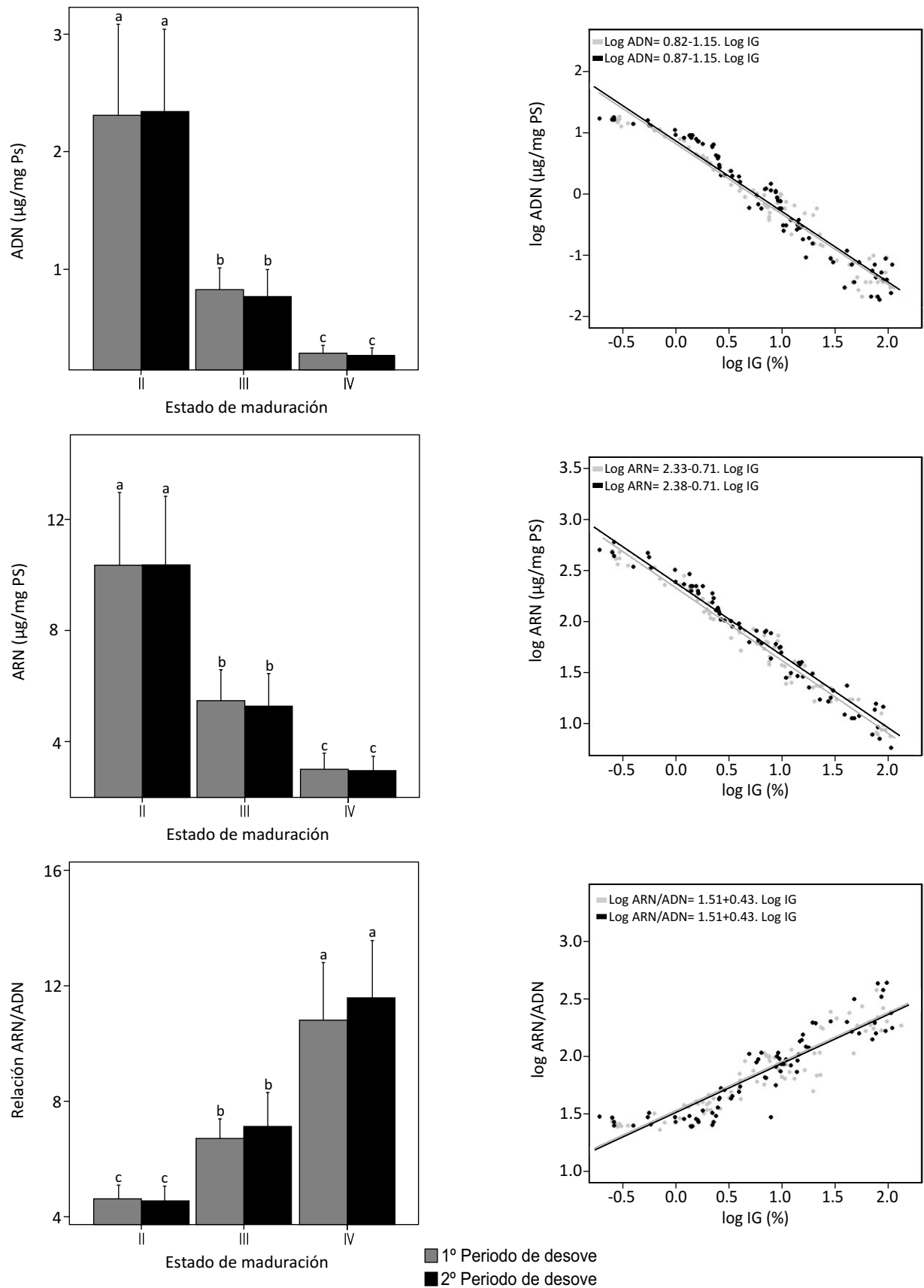


Fig. 6.17. Cambios en el contenido de ADN, ARN y de la relación ARN/ADN por mg de tejido (pero seco, PS) a lo largo del desarrollo gonadal (izquierda) y con el índice gonadosomático (derecha) de los dos periodos de desove de *M. brachydactyla* en la ría de A Coruña. Las diferentes letras superíndice situadas sobre las barras de error representan las diferencias significativas entre estados de desarrollo gonadal y entre periodos de desove (test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). En la relación del IG con las variables de estudio, se representan las rectas ajustadas mediante técnicas de regresión y su correspondiente ecuación de la recta para cada periodo de desove (PD).

Tabla 6.21. Resultados de las ANOVAS de dos vías evaluando las diferencias en el contenido en ADN, ARN y relación ARN/ADN por mg de tejido (peso seco, PS) entre estados de maduración gonadal y entre periodos de desove en la ría de Arousa y ría de A Coruña. Se presentan los grados de libertad (gl), la media cuadrática (MC), el estadístico F y el nivel de significancia P.

| Parámetros | Factor | Ría de Arousa | | | | Ría de A Coruña | | | |
|------------------|-------------------|---------------|--------|--------|---------|-----------------|--------|--------|---------|
| | | gl | MC | F | P | gl | MC | F | P |
| ADN (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 0.02 | 0.14 | 0.71 | 1 | 0.25 | 1.17 | 0.28 |
| | Estado desarrollo | 2 | 50.18 | 300.85 | p<0.001 | 2 | 65.15 | 311.68 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.04 | 0.26 | 0.77 | 2 | 0.03 | 0.15 | 0.86 |
| | Error | 129 | 0.17 | | | 165 | 0.21 | | |
| ARN (µg/mg PS) | Periodo de desove | 1 | 0.30 | 0.12 | 0.74 | 1 | 2.30 | 0.82 | 0.37 |
| | Estado desarrollo | 2 | 662.50 | 260.96 | p<0.001 | 2 | 804.70 | 283.29 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.60 | 0.23 | 0.80 | 2 | 0.20 | 0.07 | 0.94 |
| | Error | 129 | 2.50 | | | 165 | 2.80 | | |
| Relación ARN/ADN | Periodo de desove | 1 | 2.20 | 1.60 | 0.21 | 1 | 1.10 | 0.70 | 0.40 |
| | Estado desarrollo | 2 | 382.40 | 274.14 | p<0.001 | 2 | 615.80 | 390.42 | p<0.001 |
| | Periodo x Estado | 2 | 0.50 | 0.33 | 0.72 | 2 | 2.50 | 1.59 | 0.21 |
| | Error | 129 | 1.40 | | | 165 | 1.60 | | |

6.4. DISCUSIÓN

6.4.1. Características biométricas del ovario

6.4.1.1. Tamaño del ovario

Los ovarios de *M. brachydactyla*, en términos de peso húmedo y peso seco, se incrementaron a lo largo de su maduración como consecuencia de la acumulación de constituyentes orgánicos e inorgánicos del vitelo en los ovocitos a medida que avanza el desarrollo gonadal (Adiyodi & Subramoniam, 1983; Fang-Yi & Ching-Fong, 1997; Wouters *et al.*, 2001b). Este patrón se ha observado en numerosas especies de crustáceos decápodos como *Aristeus antennatus* (Rosa & Nunes, 2003b), *Armases cinereum* y *Sesarma nr. reticulatum* (Hasek & Felder, 2005), *Litopenaeus vannamei* (Wouters *et al.*, 2001b), *Macrobrachium amazonicum* (Ribeiro *et al.*, 2011) o *Procambrus clarkii* (Chen *et al.*, 2010).

El índice gonadosomático (IG), como método cuantitativo de determinación del grado de maduración del ovario, se ha empleado en numerosos estudios de desarrollo gonadal en crustáceos decápodos (Pillay & Nair, 1971; Jeckel *et al.*, 1989; Harrison, 1990; Haefner & Spaargaren 1993; Chu, 1995; López-Greco & Rodríguez, 1999; Wu *et al.*, 2007b) y expresa, en porcentaje, lo que representa el ovario con respecto al peso total del animal, por lo que es un buen indicador del grado de desarrollo de los ovarios (Vazzoler, 1996).

El índice gonadosomático en *M. brachydactyla* se incrementa progresivamente a lo largo de la maduración gonadal, alcanzando un valor medio de 5.8% en los ovarios maduros. Estos valores de incremento son similares a otras especies de crustáceos decápodos (López-Greco & Rodríguez, 1999; Cavalli *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 2001a; Rosa & Nunes, 2002, 2003a y b; Henmi, 2003; Ituarte *et al.*, 2004, 2006; Hasek & Felder, 2005; Hartnoll *et al.*, 2007, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011; Devi & Smija, 2013) o inferiores a otras (Tahara & Yano, 2004; Hasek & Felder, 2006; Kozák *et al.*, 2006; Rodríguez-González *et al.*, 2006; Phiriyangkul *et al.*, 2007; Revathi *et al.*, 2012; Baklouti *et al.*, 2013; Fatima *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Mirheydari *et al.*, 2014) donde el índice gonadosomático puede llegar a suponer en torno

a un 15% del peso corporal en especies como *Eriocheir sinensis* (Wen *et al.*, 2010), *Portunus sanguinolentus* (Ravichandran *et al.*, 2009) o *Trachysalambria curvirostris* (Yamada *et al.*, 2006).

Al comienzo de la maduración se producen los mayores incrementos de peso (peso húmedo y peso seco) y del índice gonadosomático en el ovario de la centolla. Esto podría reflejar la incorporación de nutrientes entre el ovario inmaduro (estado I), donde el tejido gonadal está principalmente compuesto por oogonias y ovocitos previtelogénicos, y el ovario iniciando la maduración (estado II), donde comienzan la actividad metabólica relacionada con la maduración, se inicia la vitelogénesis primaria y aparecen los ovocitos vitelogénicos primarios que inician la acumulación de nutrientes para su desarrollo (Rotllant *et al.*, 2007).

En el primer periodo de desove se observó un mayor incremento del peso del ovario y del IG, desde el estado II al IV, que en el segundo periodo de desove. Además los ovarios en estado II del primer periodo de desoves tienen valores más bajos, aunque las diferencias no son significativas, que los del segundo periodo de desoves. Esto podría indicar que el estado inicial de maduración, estado II, en el primer periodo de desove estaría en una peor condición nutricional, ya que la hembra viene de realizar su muda terminal, la cual conlleva un gasto energético importante, y además es su primera maduración gonadal, que realiza en condiciones ambientales con una disponibilidad menor de alimento.

Las diferencias en el peso del ovario e IG entre periodos de desove encontradas en la ría de Arousa, indican que los ovarios tienen un mayor peso en el segundo periodo de desove. Esto reflejaría una mejor condición nutricional de las hembras en este periodo, coincidiendo con el momento del ciclo de cría donde las condiciones ambientales son óptimas, que les permitiría realizar una mayor inversión en la reproducción. Todo ello estaría en concordancia con lo visto a nivel de puestas recién desovadas en el cuarto capítulo, donde se observó una mayor inversión por mg de tejido en las puestas posteriores (correspondientes al segundo periodo de desove).

6.4.1.2. Tamaño de los ovocitos

El tamaño de los ovocitos del ovario de *M. brachydactyla*, en términos de diámetro medio (245 a 708 μm) y diámetro mayor (264 a 799 μm), es similar al encontrado en estudios previos de esta especie en la misma zona geográfica (González-Gurriarán *et al.*, 1993; Rotllant *et al.*, 2007). En comparación con otros crustáceos decápodos, se observaron especies con tamaños inferiores (Ravid *et al.*, 1999; Koga *et al.*, 2000; Ituarte *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2006; Varisco & Vinuesa, 2011; Nicolau *et al.*, 2012; Revathi *et al.*, 2012; Rodríguez-García *et al.*, 2015), otras con tamaños similares (Sagi *et al.*, 1995; Yoshio, 2000; Mak *et al.*, 2005; Samyal *et al.*, 2011) e incluso algunas con tamaños muy superiores como es el caso de *Astacus leptodactylus* (Mirheydari *et al.*, 2014), *Homarus americanus* (Factor, 1995) o *Nephrops norvegicus* (Rotllant *et al.*, 2005).

El incremento de tamaño de los ovocitos a lo largo de la maduración es común para crustáceos decápodos (Sagi *et al.*, 1995; Ravid *et al.*, 1999; Koga *et al.*, 2000; Yoshio, 2000; Rotllant *et al.*, 2005; Ituarte *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2006; Revathi *et al.*, 2012; Swetha *et al.*, 2015). En centolla, que llega a triplicar su tamaño inicial, el mayor incremento se produce entre los estado I (inmaduro) y II (comienzo de la maduración), lo cual coincide con lo observado para esta especie por otros autores (González-Gurriarán *et al.*, 1993; Rotllant *et al.*, 2007) y con lo visto en otros crustáceos decápodos (Mirheydari *et al.*, 2014; Swetha *et al.*, 2015). El crecimiento en tamaño de los ovocitos está relacionado con los procesos de deposición de vitelo que tienen lugar durante la vitelogénesis, lo que provoca un significativo incremento de su diámetro (Charniaux-Cotton, 1985; Eastman-Reks & Fingerman, 1985; Harrison, 1990; Quackenbush, 1991; Lubzens *et al.*, 1995; Spaziani & Hinsch, 1997; Cavalli *et al.*, 2001; Rosa & Nunes, 2003b; Mak *et al.*, 2005).

Tanto el diámetro medio como el diámetro mayor mostraron una elevada correlación positiva con el peso seco del ovario y con el índice gonadosomático, como han visto otros autores que sugieren que el diámetro de los ovocitos puede ser usado para predecir el índice gonadosomático de las hembras en base a un análisis de regresión (Oliveira *et al.*, 2011). Estos resultados apoyarían también el empleo del índice gonadosomático como una medida fiable de estimación del grado de desarrollo del ovario.

A pesar de que en el cuarto capítulo se observaron diferencias en el tamaño de los huevos recién desovados entre periodos de desove, con un mayor tamaño de huevos en el primer periodo de desove, a nivel de ovocitos no se observaron diferencias en el tamaño de los ovocitos maduros (estado IV) entre periodos de desove de ninguna de las dos zonas de estudio. Esto puede estar relacionado con la combinación de múltiples factores como la amplitud del periodo de recogida de las muestras, ya que el muestreo de puestas del cuarto capítulo se limitó a unos meses concretos, mientras que el muestreo de desarrollo gonadal se realizó a lo largo de un periodo más amplio, o la dificultad para distinguir el grado de maduración de los ovocitos frente al grado de desarrollo de los embriones. Ambos factores podría derivar en una mayor variabilidad en el grado de maduración de los ovocitos dentro de los ovarios en estado IV y en que los ovarios del estado IV no estén en el estado de máxima maduración (a punto de desovar).

6.4.2. Composición básica del ovario

En *M.brachydactyla*, el agua constituye el componente mayoritario de los ovarios, con un rango entre 56.4% y 79.2%. Este contenido es similar al obtenido para esta especie en otras latitudes (Bodin *et al.*, 2007a y b; Marques *et al.*, 2010) y similar al observado en *Cancer pagurus* (Barrento *et al.*, 2009b), *Homarus gammarus* y *Homarus americanus* (Barrento *et al.*, 2009a), *Metapenaeus monoceros* (Abraham & Manisseri, 2007) o *Penaeus indicus* (Mohamed & Diwan, 1992), y superior al obtenido en *Eriocheir sinensis* (Sui *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2013) y *Nephrops norvegicus* (Tuck *et al.*, 1997). En cuanto la materia orgánica e inorgánica (o cenizas), los ovarios en desarrollo de centolla presentan valores de 17.5% a 34.2% y de 5.6% a 6.4% respectivamente. El contenido de materia orgánica fue similar a los obtenidos para la especie en otras latitudes (Marques *et al.*, 2010) y para otros crustáceos decápodos como *Homarus gammarus* y *Homarus americanus* (Barrento *et al.*, 2009a), pero también inferior a otros como *Eriocheir sinensis* (Wu *et al.*, 2007a; Sui *et al.*, 2009). En cambio, el contenido de cenizas de los ovarios de centolla es muy superior al visto en esta especie en otras latitudes (Marques *et al.*, 2010) y en otras especies de crustáceos decápodos (Wu *et al.*, 2007b; Barrento *et al.*, 2009a y b, 2010).

En general, el contenido de agua y materia orgánica, tanto en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco (PS) como en % PS, del ovario maduro (estado IV) es ligeramente inferior a los valores obtenidos por mg de tejido en los huevos recién desovado (estado I). El mayor contenido de agua por mg de tejido de los huevos puede estar relacionado con la entrada paulatina del agua al interior del huevo desde el momento del desove, mientras que el mayor contenido en materia orgánica, que concuerda con lo visto en *Portunus pelagicus* (Zhou *et al.*, 2011), puede estar relacionado con el aporte de nutrientes a los ovocitos poco antes del desove.

Durante la maduración el contenido en agua del ovario desciende mientras que el contenido en materia orgánica aumenta considerablemente, al igual que sucede en otros crustáceos decápodos (Mohamed & Diwan, 1992; Rosa & Nunes, 2003b; Hasek & Felder, 2005, 2006; Suneetha *et al.*, 2009). Este patrón de disminución del agua junto con el incremento de la materia orgánica, con mayores variaciones entre el estado II y III, está relacionado con la progresiva incorporación de reservas orgánicas a los ovocitos durante la vitelogénesis (Rosa & Nunes, 2003b). En cuanto a las cenizas, el descenso progresivo observado, sobre todo en la primera mitad del desarrollo, es similar al visto en *Penaeus monodon* (Suneetha *et al.*, 2009). Este descenso de la materia inorgánica, que puede incluir diversos elementos

traza que han sido vistos en el ovario de esta especie por otros autores (Marques *et al.*, 2010) como el azufre, el potasio, el manganeso, el zinc o el selenio, podría reflejar el requerimiento de estos elementos para los procesos metabólicos que tienen lugar durante la maduración (Rosa & Nunes, 2003b).

Las diferencias encontradas en el contenido en materia orgánica entre periodos de desove en la ría de A Coruña, siendo mayor el segundo periodo, pueden indicar un mayor aporte de nutrientes a los ovocitos durante la vitelogénesis y por consecuencia, una mayor inversión por mg de tejido, en el periodo de desove donde las condiciones ambientales de disponibilidad de alimento y temperatura son más favorables.

6.4.3. Composición bioquímica del ovario

Los ovarios de *M. brachydactyla* presentan una proporción de carbono (41.1%-49.7%) y de C/N (3.7-4.6) inferior a los valores observados para la misma especie en otras latitudes (Bodin *et al.*, 2007c) y en otros crustáceos decápodos como *Armases cinereum* y *Sesarma nr. reticulatum* (Hasek & Felder, 2005) o *Uca longisignalis* y *Uca nr. minax* (Hasek & Felder, 2006).

En cuanto a la fracción orgánica de los ovarios, el componente mayoritario fueron las proteínas, seguidas de los lípidos y en menor medida, de los carbohidratos como se ha visto en otros crustáceos decápodos (p. ej.: Ajmal Khan & Natarajan, 1980; Muriana *et al.*, 1993; Rosa & Nunes, 2002; Hasek & Felder, 2005, 2006; Baklouti *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2013). El contenido proteico, que oscila entre un 62.9% y un 64.3%, es similar y el contenido de carbohidratos es superior (6.4% a 7.1%) al de otras especies de crustáceos decápodos (Mohamed & Diwan, 1992; Tuck *et al.*, 1997; Palacios *et al.*, 2000; Vijayakumaran & Radhakrishnan, 2002; Abraham & Manisseri, 2007; Wu *et al.*, 2007a, 2010a). En lo que respecta al contenido lipídico, que fluctúa entre un 12%-22.4% dependiendo del estado de maduración del ovario, fue superior al encontrado para esta especie en otras latitudes (Bodin *et al.*, 2007a, b y c) y presenta diferencias con otros crustáceos decápodos con valores superiores (Cavalli *et al.*, 2000; Hasek & Felder, 2005, 2006; Alava *et al.*, 2007; Abraham & Manisseri, 2007; Wu *et al.*, 2007a, 2010a; Samyal *et al.*, 2011) o similares (Mourete *et al.*, 1990; Mohamed & Diwan, 1992; Tuck *et al.*, 1997; Wouters *et al.*, 2001a; Rosa & Nunes, 2002; Ravichandran *et al.*, 2009) de lípidos.

La proporción de los componentes bioquímicos en el ovario es de suma importancia ya que un equilibrio óptimo entre proteínas y energía es esencial para una eficiente incorporación de nutrientes en el ovario. De este modo, las proteínas, estimadas a partir de nitrógeno, se emplearían principalmente para el desarrollo de los ovocitos, mientras que los lípidos y, en menor medida, los carbohidratos serían los encargados de cubrir los requisitos energéticos durante la maduración del ovario (Harrison, 1990; Cortes-Jacinto *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006a). Además, a lo largo de la maduración gonadal tienen lugar procesos de biosíntesis de ovogénesis y de vitelogénesis, lo que lleva aparejado un alto coste de energía para generar las reservas energéticas necesarias para el desarrollo embrionario lecitotrófico (Rosa & Nunes, 2003a).

La composición bioquímica (carbono, lípidos, proteínas y carbohidratos) del ovario maduro (estado IV) de *M. brachydactyla*, tanto en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de PS como en % PS, muestra valores de carbono, lípidos, C/N y lípidos/proteínas ligeramente inferiores a los encontrados por mg de tejido en los huevos recién desovados (estado I), mientras que los valores de carbohidratos fueron superiores en una de las zonas geográficas (ría de A Coruña). En cambio, los valores de proteínas se mantienen constantes entre los dos tejidos. Esto podría estar relacionado con el acumulo de reservas exógenas, principalmente lipoproteínas, hacia el final de la vitelogénesis secundaria, justo antes del desove, y con el consumo de carbohidratos como fuente de energía en los momentos finales del desarrollo.

La tendencia observada en este estudio de incremento de carbono a lo largo de la maduración del ovario y con el aumento del índice gonadosomático ha sido vista en otras especies de crustáceos decápodos (Castille & Lawrence, 1989; Mourente & Rodríguez, 1991; Mourente et al., 1994; Bryant & Hartnoll, 1995), siendo la magnitud de este incremento (20.7%) similar al observado en *Armases cinereum* y *Sesarma nr. reticulatum* (Hasek & Felder, 2005) o en *Uca longisignalis* y *Uca nr. minax* (Hasek & Felder, 2006). Al igual que el carbono, los lípidos aumentaron a lo largo de la maduración, con un patrón similar al mostrado en estudios previos de esta especie (Alaminos, 2011), dentro del rango de incrementos observado durante la maduración gonadal en otros crustáceos decápodos (Jeckel et al., 1989; Harrison, 1990; Mohamed & Diwan, 1992; Wen et al., 2001; Rosa & Nunes, 2003a y b; Hasek & Felder, 2006; Revathi et al., 2012). Asimismo, también se apreció su incremento con el aumento del índice gonadosomático, lo cual es común con otras especies de crustáceos decápodos como *Aristeus antennatus* (Rosa & Nunes, 2003b), *Eriocheir sinensis* (Wen et al., 2001), *Fenneropenaeus merguensis* y *Fenneropenaeus penicillatus* (Fatima et al., 2013), *Parapenaeus longirostris* y *Nephrops norvegicus* (Rosa & Nunes, 2003a) o *Penaeus vannamei* (Palacios et al., 2000). Los incrementos más elevados de carbono y lípidos se produjeron entre los estados II y III de maduración, lo podría estar relacionado con el paso de una primera fase de vitelogénesis endógena (vitelogénesis primaria) a una segunda fase exógena (vitelogénesis secundaria) (Rotllant et al., 2007), donde se produce una incorporación de nutrientes, principalmente lipoproteínas, por pinocitosis a los ovocitos en crecimiento. Estas lipoproteínas proporcionarán la energía necesaria para la maduración del ovario (Harrison, 1990).

El ligero descenso de las proteínas observado sobre todo al comienzo de la maduración (estado I al estado II), es poco habitual entre crustáceos decápodos. En general, durante el proceso de vitelogénesis se produce una intensa síntesis de proteínas (Abdu et al., 2000), y por tanto, como se ha observado en otros crustáceos decápodos, un incremento en el contenido proteico (Quinitio & Millamena, 1992; Spaargaren & Haefner, 1994; Abdu et al., 2000; Rodríguez et al., 2006; Suneetha et al., 2009; Revathi et al., 2012; Fatima et al., 2013; Xu et al., 2014) o una estabilidad relativa de los valores proteicos durante el desarrollo gonadal (Biesiot & Perry, 1995; Rosa & Nunes, 2002; Hasek & Felder, 2006). La tendencia observada en el ovario de la centolla podría estar relacionada con el método de estimación, que asume que la mayor parte del nitrógeno es proteico y solo una pequeña proporción es nitrógeno no proteico (Coklin-Brittain et al., 1999; Tacon et al., 2009). En este trabajo no se ha empleado el factor de conversión más habitual (6.25; Jones, 1931) que se ha demostrado que sobreestima el contenido proteico de las muestras (Diniz et al., 2012, 2014) y se ha optado por un factor de conversión específico para organismos marinos (5.8; Gnaiger & Bitterlich, 1982). A pesar de ello, algunos autores han observado que la fracción de nitrógeno no proteico (aminas, urea, nitrógeno intracelular inorgánico, ácidos nucleicos) puede ser variable entre estados de desarrollo o modos de vida larvarios (Anger, 2001), por lo que puede llegar a provocar estimaciones sesgadas del contenido proteico. En centolla, los valores más elevados de proteínas se han observado en el ovario inmaduro (estado I), momento en el que se aprecian los valores más elevados de ácidos nucleicos (ADN y ARN), los cuales podría interferir en la estimación, provocando una sobreestimación del contenido de proteínas del ovario en este estado de desarrollo gonadal.

El patrón variable de los carbohidratos durante la maduración gonadal muestra un incremento inicial (estado I al II) y luego un descenso progresivo (estado II al IV). El incremento al comienzo de la maduración del ovario, que se ha observado también en otras especies (Rodríguez-González et al., 2006), puede estar relacionado con su acumulación de cara a la vitelogénesis, ya que pueden formar parte de las glucolipoproteínas (Harrison, 1990; Riley & Tsukimura, 1998; Tseng et al., 2001; Vinagre et al., 2007). El descenso observado a medida que avanza la maduración (estado II al IV) coincide con lo observado en otros crustáceos decápodos (Tuck et al., 1997; Rodríguez-González et al., 2006; Oliveira et al., 2011; Xu et al., 2014), y la correlación observada entre los carbohidratos y el índice gonadosomático se ha visto también en *Cherax quadricarinatus*, con un ligero descenso de este componente bioquímico con el incremento del índice gonadosomático (Rodríguez-González et al., 2006).

Este descenso de los carbohidratos podría estar relacionado con su papel como precursor de intermediarios metabólicos en la producción de energía y de aminoácidos no esenciales, y con su uso como fuente de energía durante la maduración del ovario (Harrison, 1990; Rosa & Nunes, 2003c), que en el caso de centolla es más pronunciado durante la vitelogénesis secundaria (entre el estado III y IV).

Las diferencias en el metabolismo de lípidos y de las proteínas entre crustáceos decápodos sugieren que el proceso de maduración en algunas especies está basado fundamentalmente en los lípidos, mientras que en otras tiene mayores requerimientos de proteínas para la vitelogénesis (Hasek & Felder, 2005). Algunos autores han relacionado estos patrones diferenciados con las condiciones ambientales, en particular el hábitat de la especie (zonas costeras o de aguas profundas) y la disponibilidad de alimento, que condicionan el contenido de lípidos y de proteínas en el ovario durante la maduración gonadal (Biesiot & Perry, 1995; Hasek & Felder, 2005). Por otro lado, el aumento de la relación C/N y de la relación lípidos/proteínas con el desarrollo gonadal y con el índice gonadosomático observado en este estudio, también podría indicar la acumulación de lípidos en el ovario en vez de reservas proteicas para asegurar el éxito del proceso de maduración (Hasek & Felder, 2005). Por tanto, los resultados obtenidos con este estudio parecen indicar que el proceso de maduración gonadal de *M. brachydactyla* está basado principalmente en el metabolismo de los lípidos.

El contenido energético de los ovarios, en términos de energía^s (18.9 a 22.8 J/mg) y de energía^w (21.1 a 24.8 J/mg), fue similar al rango observado en otras especies de crustáceos decápodos como *Armases cinereum* y *Sesarma nr. reticulatum* (Hasek & Felder, 2005), *Hyas coarctatus* e *Inachus dorsettensis* (Bryant & Hartnoll, 1995), *Munida subrugosa* (Romero *et al.*, 2006), *Penaeus monodon* (Suneetha *et al.*, 2009) o *Uca longisignalis* y *Uca nr. minax* (Hasek & Felder, 2006). El incremento más acusado de energía, coincidiendo con el mayor incremento de lípidos y carbono, se produjo entre los estados II y III de maduración, lo cual podría estar relacionado con el comienzo de la fase de incorporación exógena de nutrientes para el crecimiento de los ovocitos.

La comparación de las dos estimaciones de energía muestra valores más elevados en la energía calculada a partir de la composición bioquímica de lípidos, proteínas y carbohidratos (energía^w), lo cual concuerda con lo visto en otros estudios sobre crustáceos decápodos en los que las estimaciones de energía basadas en carbono subestiman el contenido energético real del tejido (Anger & Dawirs, 1982; Anger, 2001; Urzúa *et al.*, 2012).

Se ha sugerido que la maduración gonadal y el desarrollo de las puestas en crustáceos decápodos están relacionados con el estado nutricional en términos de contenido lipídico (Brown *et al.*, 1980; Middleditch *et al.*, 1980; Xu *et al.*, 1994b). Para diversas especies se han observado dos patrones diferentes en cuanto a la movilización de lípidos al ovario. En algunas especies el aporte de lípidos al ovario se ha sugerido que puede provenir en mayor medida de la ingestión inmediata en la dieta que de los lípidos o sus precursores almacenados en el hepatopáncreas (Castille & Lawrence, 1989; Harrison, 1990; Cavalli *et al.*, 2001; Rosa & Nunes, 2003b). En estos casos, en el hepatopáncreas se produciría sobre todo la transformación de lípidos de la dieta y no su almacenamiento para la vitelogénesis (Clarke, 1982; D'Abramo & Sheen, 1993) dada la limitada capacidad de almacenaje que puede tener el hepatopáncreas en algunas especies (Cavalli *et al.*, 1999). Por el contrario, en otras especies se ha descrito una importante utilización de reservas del hepatopáncreas para la vitelogénesis, de modo que el aumento de lípidos en el ovario se traduce en un descenso en el hepatopáncreas (Pillay & Nair, 1973; Millamena & Pascual, 1990; Mourente & Rodríguez, 1991; Mourente *et al.*, 1994; Albessard *et al.*, 2001; Palacios *et al.*, 2001; Rodríguez-González, 2001; Rosa & Nunes, 2003a). Estas diferencias en el patrón de movilización de los lípidos pueden deberse a diferencias nutricionales o a las características del hábitat (Castille & Lawrence, 1989), de modo que las especies con mayor disponibilidad de alimento a lo largo del año utilizarían en menor medida las reservas del hepatopáncreas (Clarke, 1982). En *M. brachydactyla*

se desconoce de dónde proviene el aporte de lípidos al ovario, si del hepatopáncreas como órgano de almacén de energía o de la ingestión inmediata de la dieta. En futuros trabajos será interesante abordar el estudio de las variaciones de la composición bioquímica del hepatopáncreas a lo largo de la maduración gonadal para conocer mejor el proceso de movilización de los lípidos al ovario.

Entre periodos de desove se han constatado diferencias en la composición bioquímica de los ovarios de *M. brachydactyla* en las dos zonas geográficas, sobre todo en el contenido de carbono, de lípidos y de energía (energía^s y energía^w). Estas diferencias pueden estar influenciadas por las diferentes condiciones ambientales reinantes, principalmente temperatura y disponibilidad de alimento (en términos tanto de abundancia como de diversidad de presas) en los dos periodos de desoves. Asimismo, la menor temperatura en el medio natural en la época del primer desove hace que el gasto energético para los procesos metabólicos de la hembra sea mayor. Estas variaciones podrían influir, entre otras cosas, en la incorporación de nutrientes a la dieta de las hembras, y por tanto, en el aporte de reservas energéticas al ovario durante el proceso de maduración. Se ha constatado que el contenido de carbono y lípidos y energía (energía^s y energía^w) por mg de tejido es más elevado en los ovarios maduros (estado IV) del segundo periodo de desove. Esto podría indicar que este posible gasto energético estaría compensado por las mejores condiciones ambientales del segundo periodo de desove para el ciclo reproductivo de las hembras de *M. brachydactyla*. Esta tendencia coincide con lo visto en el cuarto capítulo en los huevos recién desovados (estado I), donde la mayor inversión energética en la puesta se observa en las puestas posteriores que tienen lugar durante el segundo periodo de desove, y podría reflejar la diferente estrategia reproductiva descrita para cada periodo de desove en el tercer y cuarto capítulo de esta tesis.

Los dos métodos empleados para determinar la composición bioquímica básica de los ovarios de *M. brachydactyla* muestran una alta correlación entre el contenido de carbono y de lípidos, observándose las mismas tendencias para las dos variables a lo largo de la maduración del ovario. Esto indicaría que los análisis elementales de carbono pueden ser empleados como estimadores indirectos de la composición de lípidos, como se ha visto en otros crustáceos decápodos (Hasek & Felder, 2005, 2006).

6.4.4. Composición de clases de lípidos

De las clases de lípidos analizadas en los ovarios de *M. brachydactyla*, los fosfolípidos (62.8% en estado I y 51.2% en estado IV) y los neutrolípidos (25% en estado I y 36.2% en estado IV) son los que se encontraron en mayor proporción, mientras que los glucolípidos, fueron los componentes minoritarios (12.2 en estado I y 13.2% en estado III). En general, entre especies de crustáceos decápodos esta tendencia se mantiene para los glucolípidos pero es variable para las otras dos clases de lípidos. Así, hay especies donde los neutrolípidos son superiores en proporción a los fosfolípidos (Teshima *et al.*, 1989; Cavalli *et al.*, 2000, 2001; Rosa & Nunes, 2003b; Alava *et al.*, 2007; Sui *et al.*, 2009) y otras donde sucede lo contrario (Teshima & Kanazawa, 1983; Mourente *et al.*, 1990; Mourente & Rodríguez, 1991; Ravid *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 2000; Wouters *et al.*, 2001a; Boucard *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2010c; Srinivasan *et al.*, 2012).

Los fosfolípidos son requeridos para la reproducción ya que su aporte en la dieta mejora la inversión energética de las hembras (Alava *et al.*, 1993; Cahu *et al.*, 1994), también para la maduración del ovario ya que están implicados en la síntesis de vitelo (Alava *et al.*, 1993; Srinivasan *et al.*, 2012), y para el crecimiento en crustáceos (Conklin *et al.*, 1980; D'Abramo *et al.*, 1981; Teshima *et al.*, 1986; Baum *et al.*, 1990;). Además son constituyentes esenciales de las membranas celulares y juegan un papel esencial en el transporte de lípidos por la hemolinfa y en la absorción de ácidos grasos (Teshima, 1997). Por otra parte, los neutrolípidos, tiene una función esencialmente energética (Middleditch *et al.*, 1979; Ward *et al.*, 1979; Teshima & Kanazawa, 1983; Wouters *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2006; Haché *et al.*, 2015).

Aunque en el ovario se encuentran en proporciones menores que los fosfolípidos, sus valores serían suficientes para cubrir el futuro coste energético del desarrollo embrionario, complementándose con otras fuentes de energía minoritarias como los carbohidratos (Albessard *et al.*, 2001). Asimismo, algunos autores han indicado que los neutrolípidos, y más concretamente los triglicéridos, ingeridos por la dieta durante la maduración del ovario pueden ser transformados enzimáticamente en monoglicéridos y diglicéridos, que luego se convertirán en fosfolípidos en el hepatopáncreas (Chang & O'Connor, 1983). Posteriormente, estos fosfolípidos sintetizados serían transportados por la hemolinfa, en forma de lipoproteínas de alta densidad, al ovario en desarrollo (Allen, 1972; Lee & Puppione, 1978; Harrison, 1990; Teshima & Kanazawa, 1980; Ravid *et al.*, 1999; Wouters *et al.*, 2001b). Y por último, se ha observado que los glucolípidos son esenciales para el crecimiento y la resistencia a condiciones de estrés (Srinivasan *et al.*, 2012).

La predominancia de los fosfolípidos como principal clase de lípidos en los ovarios de centolla, puede estar relacionada con una mayor transferencia de esta clase de lípidos, directamente desde la dieta o indirectamente desde el hepatopáncreas, al ovario en maduración, como ha sido sugerido en otros crustáceos decápodos (Teshima & Kanazawa, 1980; Harrison, 1990; Spaargaren & Haefner, 1994; Cheng *et al.*, 1998; Cavalli *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 2001). Por tanto, esta predominancia podría sugerir que las hembras de centolla realizan una mayor inversión en la síntesis de componentes estructurales de membrana, que son esenciales para la producción y desarrollo de los huevos, en detrimento de la acumulación de lípidos como reserva energética (Albessard *et al.*, 2001).

Al igual que en otras especies de crustáceos decápodos (Ravid *et al.*, 1999; Chansela *et al.*, 2012; Srinivasan *et al.*, 2012) el contenido de las tres clases de lípidos por mg de tejido presenta un incremento considerable durante la maduración del ovario de centolla, lo que podría reflejar su importancia en los procesos que tienen lugar durante la vitelogénesis. El mayor incremento observado entre el estado I y II en los lípidos neutros, momento de comienzo de la vitelogénesis primaria, podría estar relacionado con la acumulación de reservas endógenas para la producción de ovocitos, ya que en este periodo hay una gran proliferación de oogonias y aparecen los ovocitos vitelogénicos primarios. En cuanto a los glucolípidos, el mayor incremento se produce en la primera parte de la maduración (estado I al III), lo cual podría reflejar su importancia como fuente de energía y como constituyente de las glucolipoproteínas. En cambio, el mayor incremento de fosfolípidos por mg observado entre el estado II y III, podría estar relacionado con el comienzo de la vitelogénesis secundaria y la entrada por pinocitosis de nutrientes exógenos, principalmente lipoproteínas, a los ovocitos.

Por otro lado, en términos de porcentaje de lípidos, la tendencia cambia, los fosfolípidos descienden, los neutrolípidos aumentan y los glucolípidos, primero se incrementan y luego descienden. Esta tendencia para los fosfolípidos y los neutrolípidos se ha visto en otras especies de crustáceos decápodos como *Aristeus antennatus* (Rosa & Nunes, 2003b) o *Litopenaeus vannamei* (Wouters *et al.*, 2001b). La relativa mayor proporción de fosfolípidos en los ovarios previtelogénicos (estado I) podría reflejar probablemente su contribución a la estructura de las membranas celulares del ovario (Ravid *et al.*, 1999).

En general en las dos zonas geográficas, la cantidad de neutrolípidos y fosfolípidos de los ovarios maduros (estado IV), tanto por mg de tejido como por porcentaje de lípidos, es ligeramente inferior a la de los huevos recién desovados (estado I) mientras que la cantidad de glucolípidos es superior. Esto podría estar relacionado con la acumulación de vitelo en los ovocitos en la fase final de la vitelogénesis, y en el caso de los glucolípidos, podría indicar un consumo de esta clase de lípidos como fuente de energía para el proceso de desove. En otras especies de crustáceos decápodos se han visto patrones contrarios, con una mayor cantidad de neutrolípidos y fosfolípidos en las gónadas maduras que en los huevos recién desovados (Alava *et al.*, 2007).

Las diferencias observadas entre periodos de desove para el contenido en fosfolípidos y glucolípidos por mg de ovario maduro ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) coincidieron con los patrones observados entre puestas en el medio natural. Así, los glucolípidos son más abundantes en los ovarios del primer periodo de desove mientras que los fosfolípidos son más abundantes en el segundo periodo de desove. Esta similar tendencia de las clases lipídicas de ovarios maduros y de huevos recién desovados se ha observado también en otras especies de crustáceos (Albessard *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2011) y reflejan la transferencia directa del contenido lipídico del ovario al huevo.

6.4.5. Composición de ácidos grasos

6.4.5.1. Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos presentes en los ovarios maduros de *M. brachydactyla* consta de un número total de ácidos grasos (40) superior al encontrado en otras especies de crustáceos decápodos como *Cancer pagurus* (18 ácidos grasos, Barrento *et al.*, 2009b, 2010), *Eriocheir sinensis* (17 o 14 ácidos grasos, Ying *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2014), *Lysmata amboinensis* (Tziouveli & Smith, 2012), *Scylla paramamosain* (24 ácidos grasos, Jiang *et al.*, 2014), *Portunus trituberculatus* (21 ácidos grasos, Jiang *et al.*, 2014) o *Portunus pelagicus* (27 ácidos grasos, Zhou *et al.*, 2011). Este perfil de ácidos grasos es un reflejo de los requerimientos que tiene la maduración del ovario de *M. brachydactyla*, pero también de los ácidos grasos que son requeridos por los embriones en desarrollo tras el desove, al igual que se ha sugerido para otras especies de crustáceos decápodos como *Aristeus antennatus* (Rosa & Nunes, 2003b), *Litopenaeus vannamei* (Wouters *et al.*, 2001a), *Macrobrachium rosenbergii* (Cavalli *et al.*, 2001) o *Nephrops norvegicus* (Rosa & Nunes, 2002). El número de ácidos grasos cuantificados en los ovarios de centolla se incrementó al comienzo de la maduración (estado I al estado II), momento a partir del cual se mantuvo estable durante toda la maduración. En vista de los resultados, se podrían distinguir dos perfiles de ácidos grasos: un perfil de ovario inmaduro (estado I), con un menor número de ácidos grasos y una mayor presencia de ciertos ácidos grasos (ISO 16:0, 18:1w13, 20:1w14, 20:2w9,15 y 22:5w3); y un segundo perfil de ovario en desarrollo con un mayor número de ácidos grasos y en el que los ácidos grasos mencionados bajan notablemente su proporción. Dentro de este segundo perfil de ácidos grasos hubo ligeras variaciones entre las rías, destacando en la ría de A Coruña la ausencia de dos poliinsaturados, el 20:3w3 y 22:2w6, y en la ría de Arousa de dos saturados, el 23:0 y del 24:0. Cabe destacar que estos ácidos grasos se encontraban en muy baja proporción en los perfiles donde aparecían, estando en algunas ocasiones próximos al límite de detección de la técnica por lo que su ausencia puede ser debida más a su escasa cantidad en los ovarios de centolla que a una influencia de las características ambientales del hábitat de la centolla en las dos zonas geográficas.

La diferencia en el perfil de ácidos grasos entre el ovario inmaduro y los ovarios en maduración podría estar relacionada con la condición fisiológica de la hembra y su dieta. Las hembras juveniles que van a realizar su muda terminal modifican su dieta, incrementando el consumo de gasterópodos y otros organismos con alto contenido en carbonato cálcico para su empleo en el proceso de calcificación del nuevo exoesqueleto (Bernárdez *et al.*, 2000). Además, después de la muda terminal, tiene que dedicar los nutrientes que ingieren con la dieta a recuperar su biomasa y alcanzar un nivel mínimo adecuado que les permita comenzar la maduración del ovario e iniciar su primer ciclo de cría. Como consecuencia de los cambios en la dieta antes de la muda y la baja condición fisiológica de las hembras recién mudadas, el perfil de ácidos grasos del ovario inmaduro es menos diverso y presenta entre los ácidos grasos principales ciertos ácidos grasos (ISO 16:0, 18:1w13, 20:1w14, 20:2w9,15 y 22:5w3) poco habituales o ausentes en el perfil general del ovario tanto de *M. brachydactyla* como de otros crustáceos decápodos (Cavalli *et al.*, 2001; Rosa & Nunes, 2002, 2003a y b; Ying *et al.*, 2006; Barrento *et al.*, 2009b, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Tziouveli & Smith, 2012; Jiang *et al.*, 2014), de tal manera, que no se encontró información en la literatura sobre el papel de estos ácidos grasos en los crustáceos decápodos. Asimismo, el descenso de

estos ácidos grasos, sobre todo al comienzo de la maduración (estado I a II), podría indicar que algunos de estos ácidos grasos podrían convertirse por desaturación en ácidos grasos saturados (Rosa *et al.*, 2007) o ser empleados para cubrir los requerimientos energéticos del ovario en el paso de la fase previtelogénica a la vitelogénesis primaria, fase con una intensa actividad metabólica, donde se produce una síntesis y acumulación de vitelo de forma endógena en el ovocito.

Por lo general, el perfil de ácidos grasos del ovario maduro (estado IV) fue similar al observado en los huevos recién desovados (estado I) en el medio natural, con pequeñas variaciones observadas principalmente en los ácidos grasos presentes en muy baja proporción. Esta similitud entre perfiles coincide con lo visto en otras especies de crustáceos decápodos como *Litopenaeus vannamei* (Wouters *et al.*, 2001a), *Portunus pelagicus* (Zhou *et al.*, 2011) o *Scylla serrata* (Alava *et al.*, 2007).

6.4.5.2. Incremento total de ácidos grasos

El incremento del contenido total de ácidos grasos a lo largo de la maduración del ovario de *M. brachydactyla* se ha observado en otros crustáceos decápodos (Wouters *et al.*, 2001a; Alava *et al.*, 2007; Chansela *et al.*, 2012). De forma general, se observó un primer período de inicio de la maduración (entre los estados I y II) con un elevado incremento de los ácidos grasos, coincidiendo con el comienzo de la vitelogénesis primaria o fase endógena, donde comienzan a producirse, a partir de las oogonias, ovocitos vitelogénicos primarios y se produce una síntesis y acumulación de vitelo (Rotllant *et al.*, 2007). A continuación, se apreció un periodo de incremento menor entre los estados II y IV, periodo durante el cual la vitelogénesis primaria endógena se convierte en una vitelogénesis secundaria exógena, y comienzan a incorporarse nutrientes por pinocitosis al interior del ovocito (Rotllant *et al.*, 2007). Esta incorporación de ácidos grasos totales al ovario durante la maduración puede tener además como finalidad su uso posterior en la embriogénesis, ya que algunos ácidos grasos tiene, entre otras funciones, un papel fundamental como componentes estructurales de las membranas celulares o en la formación del sistema nervioso central de los embriones (Xu *et al.*, 1994b; Cahu *et al.*, 1995; Wen *et al.*, 2002).

El contenido total de ácidos grasos por mg de los ovarios maduros (estado IV) fue inferior al de huevos recién desovados (estado I), lo que puede estar relacionado con una posible acumulación de nutrientes en los ovocitos en los momentos finales de la maduración. Esta menor cantidad de ácidos grasos en los ovarios maduros respecto a los embriones en su etapa inicial difiere de lo encontrado en otros crustáceos decápodos, donde se observó una menor cantidad de ácidos grasos en los huevos (Alava *et al.*, 2007). También hay que tener en cuenta que factores como la amplitud del periodo de recogida de muestras de ovario, que se realizó en un periodo de tiempo más amplio que el de las puestas, o la dificultad para distinguir el grado de maduración de los ovocitos frente al grado de desarrollo de los embriones, que en combinación podrían derivar en una mayor variabilidad en el grado de maduración de los ovocitos dentro de los ovarios en estado IV y en que los ovarios del estado IV no estén en el estado de máxima maduración (a punto de desovar).

Las diferencias en el contenido total de ácidos grasos por mg de tejido entre periodos de desove, siguieron la misma tendencia observada en los huevos recién desovados (estado I), siendo mayor el contenido total de ácidos grasos del ovario en el segundo periodo de desove en las dos zonas geográficas. Esta diferencia entre periodos de desove, al igual que entre puestas, puede estar relacionadas con la variabilidad estacional en la composición de la dieta, observada por Bernárdez *et al.* (2000) para esta especie en la ría de Arousa, con una mayor disponibilidad y diversidad de presas en primavera-verano, momento del segundo periodo de desove. Además, esta mayor composición en ácidos grasos de los ovarios en el segundo periodo de desove también coincide con la estrategia observada en los huevos de una mayor inversión por mg de tejido en las puestas posteriores del ciclo de cría.

6.4.5.3. Composición por grupos de ácidos grasos

El grupo de ácidos grasos en mayor abundancia en los ovarios de *M. brachydactyla* fueron los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), entre un 43.9% y un 65.1% del total de ácidos grasos, seguidos por los monoinsaturados (MUFA, 20.5%-29.2%), los saturados (SFA, 10.6%-25.1%) y los ramificados (BFA, 1.8%-3.7%). Esta distribución coincidió con lo observado para esta especie en las costas escocesas, presentando proporciones dentro del mismo rango de valores (SFA: 23.0%, MUFA: 28.0% y PUFA: 42.9%) (Marques *et al.*, 2010), y también con la distribución observada en los huevos recién desovados (estado I) del segundo capítulo. En comparación con otros crustáceos decápodos se observaron diferentes patrones de distribución por grupos de ácidos grasos, con predominancia de poliinsaturados, al igual que centolla (Mourete *et al.*, 1990; Ravid *et al.*, 1999; Alava *et al.*, 2007; Barrento *et al.*, 2009b, 2010) o de monoinsaturados (Wen *et al.*, 2001; Ying *et al.*, 2006; Peixoto *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2011; Srinivasan *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014) o de saturados (Wu *et al.*, 2010b; Tziouveli & Smith, 2012; Jiang *et al.*, 2014). La prevalencia de los poliinsaturados en los ovarios de *M. brachydactyla* frente a los otros dos grupos puede estar relacionado con el hábitat donde viven y con el tipo de dieta que consumen, la cual afecta directamente a la abundancia de ácidos grasos específicos en tejidos como el ovario, como se ha visto en diferentes experiencias con dietas controladas en otros crustáceos decápodos (Lytle *et al.*, 1990; Alava *et al.*, 1993; Cahu *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994a; Ravid *et al.*, 1999). Además la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados esenciales de 18 y de 20 carbonos (43.4% a 64%), conocidos marcadores de productores primarios (Rosa *et al.*, 2007), puede reflejar la dieta rica en macroalgas (principalmente algas laminarias o coralinas) de las hembras de *M. brachydactyla* (Kergariou, 1974, 1984; Bernárdez *et al.*, 2000).

El contenido de los tres grupos de ácidos grasos en el ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de PS) se incrementa considerablemente a lo largo de la maduración del ovario, al igual que se ha visto en otros crustáceos decápodos (Cavalli *et al.*, 2001; Alava *et al.*, 2007). El comienzo del desarrollo gonadal (estado I al II) fue el momento del mayor incremento para todos los grupos, exceptuando los BFA. Los ácidos grasos saturados fueron el grupo que experimentó un mayor aumento, incrementándose su contenido casi 6 veces durante la maduración. Esto podría estar relacionado con su función como reserva energética tanto para el proceso de vitelogénesis como para el de embriogénesis y con la capacidad de las hembras de sintetizarlos de novo u obtenerlos a partir de la desaturación de los MUFA y PUFA (Chang & O'Connor, 1983; Mourete, 1996; Rosa *et al.*, 2007). Esta capacidad de síntesis de SFA durante la maduración gonadal ha sido observada en otras especies de crustáceos decápodos como *Chorismus antarticus* (Clarke, 1982) o *Litopenaeus vannamei* (Wouters *et al.*, 2001b). En cuanto al aumento de los MUFA, por un lado puede estar relacionado con su papel energético, al igual que los SFA, durante el desarrollo del embrión (Clarke *et al.*, 1990), y por otro, puede ser un reflejo del aumento de los lípidos neutros en los ovarios, ya que esta clase de lípidos presenta una mayor cantidad relativa de MUFA que la otra clase de lípidos predominante, los fosfolípidos (Ravid *et al.*, 1999). Y en el caso de los PUFA, se ha constatado en otras especies de crustáceos decápodos la importancia de su acumulación durante la maduración del ovario, ya que una carencia de algunos PUFA puede provocar el desarrollo de huevos de baja calidad (Middleditch *et al.*, 1980; Cahu & Fauvel, 1986; Millanema & Pascual, 1990), y también su papel clave en la estimulación de la fecundidad de las hembras, pues se ha visto que las dietas enriquecidas con una cierta cantidad de PUFA promueven una mayor fecundidad y tasa de eclosión en las hembras (Xu *et al.*, 1994b; Cavalli *et al.*, 1999; Wouters *et al.*, 2001c; Chansela *et al.*, 2012).

En cuanto al porcentaje de estos grupos de ácidos grasos en el ovario, la tendencia es similar que por mg de tejido para los SFA y MUFA, cuyo porcentaje se incrementa. Pero para los PUFA, la tendencia cambia descendiendo su proporción a lo largo de la maduración gonadal. Esta disminución de la proporción de PUFA en el ovario se ha observado en otros crustáceos decápodos como *Aristeus antennatus* (Rosa & Nunes, 2003b) o *Litopenaeus vannamei* (Wouters *et al.*, 2001b), y puede estar relacionada con la

función de algunos poliinsaturados (20:4w6, 20:5w3, 22:6w3) como precursores de las prostaglandinas, las cuales tienen un papel fundamental en la regulación de la maduración del ovario (Sarojini *et al.*, 1989; Sreenivasula Reddy *et al.*, 2004; Wimuttisuk *et al.*, 2013).

La cantidad de SFA, MUFA y PUFA de los ovarios maduros (estado IV), tanto por mg de tejido como por porcentaje, es ligeramente inferior a la de los huevos recién desovados (estado I) en las dos zonas geográficas. Esto podría indicar un consumo de ácidos grasos en los momentos próximos al desove del ovario maduro (estado IV).

Las diferencias entre periodos de desove, con un mayor contenido de SFA en el ovario ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de PS) del primer periodo de desove y de MUFA y PUFA en el segundo periodo de desove, es coherente con el patrón encontrado en los huevos recién desovados (estado I), con un mayor contenido energético en las primeras puestas y un mayor contenido en ácidos grasos esenciales en las puestas posteriores. Este patrón podría reflejar el efecto de la variabilidad en las condiciones ambientales, sobre todo en lo referente a la temperatura y a la disponibilidad de alimentos, sobre la composición de ácidos grasos del ovario. En este sentido, las fluctuaciones en la abundancia y disponibilidad de presas potenciales de la dieta de centolla, vista por Bernárdez *et al.* (2000) en la ría de Arousa, con una predominancia de las macroalgas del género Laminariacea y del bivalvo, *Mytillus* sp. en el invierno (primer periodo de desove), una mayor proporción de holoturias (principalmente *Aslia lefevrei*), y la aparición de otras presas con cierta abundancia como ascidias solitarias en el verano (segundo periodo de desove), podrían estar relacionadas con la mayor proporción de ácidos grasos esenciales encontrada en los ovarios del segundo periodo de desove, ya que en otros crustáceos decápodos se ha constatado que la cantidad de ácidos grasos esenciales en los tejidos refleja en gran medida la dieta de las hembras (Lytle *et al.*, 1990; Alava *et al.*, 1993; Cahu *et al.*, 1994, 1995; Xu *et al.*, 1994a; Racotta *et al.*, 2003; Boucard *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; Calado *et al.*, 2010). En general, no existe información suficiente sobre la composición de ácidos grasos de las presas que constituyen la dieta de *M. brachydactyla* en las costas gallegas ni en zonas próximas que permita relacionar de una forma más precisa cuales son los aportes de ácidos grasos, sobre todo esenciales, de estas presas al tejido ovárico de las hembras.

6.4.5.4. Composición de los principales ácidos grasos

6.4.5.4.1. Ácidos grasos saturados

Los ácidos grasos saturados más importantes, en términos de proporción del total de ácidos grasos, en los ovarios de *M. brachydactyla* son el 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0. De ellos, el 16:0 y el 18:0, aparecen también como predominantes en esta especie en otras latitudes (Marques *et al.*, 2010), aunque con proporciones inferiores en el caso del 16:0 (12.6%). Cabe destacar la ausencia del 17:0, que en el estudio de Marques *et al.* (2010) aparece pero en baja proporción (0.7%) y que tampoco se observó en los huevos recién desovados del segundo capítulo. Esta ausencia podría estar relacionada con las diferencias en la composición de la dieta entre zonas, o con una menor disponibilidad de este ácido graso sintetizado por bacterias heterotróficas marinas en los hábitats de la centolla en las rías gallegas. La predominancia del 16:0 y el 18:0, es común a otros crustáceos decápodos donde su proporción llega a suponer más del 20% del total de ácidos grasos (Wen *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 2001b; Rosa & Nunes, 2003b).

Como en el estudio de Marques *et al.* (2010) no se indica el estado de madurez del ovario, las proporciones encontradas para los principales ácidos grasos fueron comparadas con los valores de este estudio en los tres estados de madurez (estado II, III y IV) para evitar diferencias debidas al estado de madurez del ovario.

6.4.5.4.2. Ácidos grasos monoinsaturados

Los ácidos grasos monoinsaturados predominantes en este estudio (16:1w7, 18:1w7, 18:1w9) coincidieron en predominancia y proporción (ovario maduro: 7.5% de 16:1w7, 5.5% de 18:1w7 y 12.5% de 18:1w9) con lo observado para esta especie en las costas escocesas por Marques *et al.* (2010). La proporción similar observada para el 18:1w9, marcador general de dieta carnívora (Auel *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002; Dalsgaard *et al.*, 2003), y en la relación 18:1w7/18:1w9 en los dos estudios podría indicar que la centolla tiene una dieta con una proporción considerable de presas animales tanto en las costas gallegas como en las escocesas. Esto concuerda con los estudios de dieta realizados en diferentes áreas de su distribución, donde se observan la presencia en su dieta de moluscos, equinodermos o gasterópodos (Kergariou, 1974; Brosnan, 1981; Bernárdez *et al.*, 2000). También en otros crustáceos decápodos el 18:1w9 es el ácido graso monoinsaturado con mayor proporción en los ovarios, llegando a suponer más del 25% del total de ácidos grasos en *Eriocheir sinensis* (Wen *et al.*, 2001) y en *Nephrops norvegicus* (Rosa & Nunes, 2002).

6.4.5.4.3. Ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados principales de este estudio (18:2w6, el 18:3w6, el 20:4w6, el 20:5w3 y el 22:6w3) difieren en predominancia y proporción con el estudio de Marques *et al.* (2010). La ausencia del 18:3w6 y la presencia de un nuevo poliinsaturado, el 16:4w3, en las centollas de las costas escocesas, junto con la mayor proporción de 18:2w6, de 20:5w3 y de 22:6w3, con un incremento en el contenido de estos ácidos grasos del 60.6%, 43% y del 27% respectivamente, y la menor proporción del 20:4w6 y del 22:5w3, con una disminución del 20.1% y del 67.3% respectivamente, en los ovarios de las centollas gallegas con respecto a las escocesas, podría estar relacionado con las diferencias en la composición de la dieta entre zonas geográficas. El 20:5w3 y el 22:6w3, poliinsaturados encontrados en mayor proporción en los ovarios, suponen un mínimo del 37% del total de ácidos grasos del ovario, lo cual es superior al rango observado para otros crustáceos decápodos como *Aristeus antennatus* (máximo de 38.3%, Rosa & Nunes, 2003b), *Eriocheir sinensis* (máximo de 11.9%, Wen *et al.*, 2001), *Litopenaeus vannamei* (Wouters *et al.*, 2001b) o *Nephrops norvegicus* (máximo de 18.4%, Rosa & Nunes, 2002).

Las relaciones w3/w6, 20:5w3/20:4w6 y 20:5w3/22:6w3 presentaron valores superiores, y la relación 18:1w7/ 18:1w9 un valor similar a lo observado para esta especie en las costas escocesas por Marques *et al.* (2010). En general, los valores de estas relaciones fueron más elevados que en lo visto en otros crustáceos decápodos como *Cancer pagurus* (Barrento *et al.*, 2009b, 2010), *Eriocheir sinensis* (Wen *et al.*, 2001), *Litopenaeus vannamei* (Wouters *et al.*, 2001b) o *Nephrops norvegicus* (Rosa & Nunes, 2002).

La mayoría de los ácidos grasos principales (en µg/mg de PS y en % PS) se incrementaron durante la maduración gonadal, especialmente en el comienzo de la maduración (estado I al II). Esto podría indicar que al comienzo de la maduración se produce una gran actividad metabólica con procesos de síntesis e incorporación de ácidos grasos a los ovocitos. Los ácidos grasos con una tendencia diferente fueron el 18:3w6, que descendió a lo largo de la maduración y el 18:2w6, 20:5w3 y el 22:6w3 que mostraron una tendencia contraria, con un incremento en contenido por mg de tejido y una disminución por porcentaje a lo largo de la maduración del ovario. En el 20:4w6 aunque la tendencia general del estado I al IV fue de incremento, en términos de porcentaje el incremento solo se observó entre el estado I y II, produciéndose a continuación un descenso (13%) de su proporción hasta el final del desarrollo. El 18:3w6, tienen un papel como intermediario de la ruta de biosíntesis del 20:4w6 y el 18:2w6 es el precursor de esa ruta de biosíntesis, esto sugiere que durante la vitelogénesis podría haber una conversión del 18:2w6 en 20:4w6, el cual es un ácido graso esencial para el desarrollo del embrión por su papel como componente de las membranas celulares, entre otros (Lilly & Bottino, 1981; Xu *et al.*, 1994a; Cahu *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2012). El descenso en la proporción del

20:4w6, del 20:5w3 y del 22:6w3, al igual que se vio con el descenso del grupo de los PUFA, podría estar relacionado con su papel como precursores de las prostaglandinas, ya que en varios trabajos se ha constatado el incremento de las prostaglandinas durante la maduración del ovario de crustáceos decápodos (Spaziani *et al.*, 1993; Sreenivasula Reddy *et al.*, 2004).

Desde el ovario inmaduro al ovario maduro hay un descenso de las relaciones w3/w6, 18:1w7/18:1w9, 20:5w3/20:4w6, sobre todo en la relación 20:5w3/20:4w6 que disminuye un 52%. El descenso más pronunciado se aprecia entre el estado I (inmaduro) y el estado II (comienzo de la madurez), lo que podría estar relacionado con las diferencias en la dieta de las hembras. Las hembras con ovarios inmaduros acaban de realizar la muda terminal y su dieta en los momentos previos a la muda es diferente (Bernárdez *et al.*, 2000) a la de hembras que cuyo ovario ya está en pleno proceso de maduración. En cuanto a la relación 20:5w3/22:6w3 presenta un patrón variable con un descenso entre el estado II y III y un incremento del estado III al IV. Asimismo, el mayor valor de las relaciones 20:5w3/20:4w6 y 20:5w3/22:6w3 en los ovarios inmaduros puede estar relacionado con el papel del 20:5w3 como precursor de las prostaglandinas, que se van incrementando durante la gametogénesis debido a su función reguladora de la maduración gonadal (Sarojini *et al.*, 1989; Sreenivasula Reddy *et al.*, 2004; Wimuttisuk *et al.*, 2013). El descenso de la relación w3/w6 durante la maduración, indica un aumento de los ácidos grasos de la serie w6 que tienen un papel importante en el ciclo reproductivo (Bhavan *et al.*, 2010), ya que valores altos de w6 pueden incrementar la fecundidad de las hembras (Cavalli *et al.*, 1999).

En general, los ácidos grasos principales del ovario maduro (estado IV) de *M.brachydactyla* coinciden con lo observado en los huevos recién desovados del segundo capítulo, lo cual también se ha visto en otras especies de crustáceos decápodos como *Portunus pelagicus* (Zhou *et al.*, 2011) o *Scylla serrata* (Alava *et al.*, 2007). Las proporciones de los ácidos grasos principales son similares entre ovario maduro y huevo recién desovado, exceptuando una mayor proporción de 14:0 y 18:3w6, que en el caso de este último pasa de una proporción de 0.6% en el ovario maduro a valores mínimos de 0.01% (huevos recién desovados en la ría de A Coruña), o su ausencia en el huevo (huevos recién desovados en la ría de Arousa), y una menor proporción de 18:0 y de 18:2w6, que en el huevo se encuentran en proporciones más elevadas (entre el 4.3% y el 5.6% para el 18:0 y entre el 1.6% y el 1.8% para el 18:2w6) que en el ovario maduro. Estas diferencias entre proporciones de ácidos grasos individuales en los dos tejidos pueden estar relacionadas con los procesos de biosíntesis de ácidos grasos. Así, la mayor proporción de 18:3w6 y la menor proporción de 18:2w6 en los ovarios maduros podrían reflejar procesos de biosíntesis de 20:4w6 en el ovario maduro al final del desarrollo gonadal. Por otro lado, la ausencia del 20:1w9 entre los ácidos grasos monoinsaturados principales en el ovario maduro (estado IV) difiere de lo encontrado en los huevos recién desovados (estado I) del cuarto capítulo. Esta diferencia es una consecuencia del límite fijado (1% del total de ácidos grasos) para considerar un ácido graso principal más que de grandes diferencias de proporciones entre ovario maduro, donde supone el 0.8% del total de ácidos grasos, y el huevo recién desovado, donde su proporción es ligeramente superior, llegando al 1%. En cuanto a los ratios, los ovarios maduros presentaron similares valores para las relaciones 18:1w7/18:1w9 y 20:5w3/22:6w3, mientras que las relaciones w3/w6 y 20:5w3/20:4w6 fueron superiores en los huevos recién desovados. Esto podría indicar una mayor cantidad de ácidos grasos de la serie w3 en los huevos recién desovados, los cuales son esenciales para el desarrollo embrionario (Beltz *et al.*, 2007; Brett *et al.*, 2009), para el incremento de las tasas de eclosión (Balamurugan *et al.*, 2015) y para la obtención de larvas de mejor calidad (Xu *et al.*, 1994a y b; Cahu *et al.*, 1995; Wouters *et al.*, 1999).

Las diferencias de los ácidos grasos principales por mg de tejido entre periodos de desove muestran, en general, un mayor contenido de 16:0, 18:0 y 16:1w7 en los tres estados de desarrollo gonadal del primer periodo, y del resto de ácidos grasos en el segundo periodo de desove. Como excepción el 18:3w6 que fue mayor en el primer periodo de desove en Arousa y en el segundo periodo en A Coruña. Al igual que lo

visto entre puestas en el segundo capítulo, el patrón observado para cada ácido graso se mantiene en las dos zonas de estudio. Esto indicaría que las oscilaciones estacionales de la dieta caracterizadas por Bernárdez *et al.* (2000) en una de las zonas de estudio podrían estar influyendo en el contenido mayor o menor de cada ácido graso en uno y otro periodo de desove. Por otro lado, las diferencias en el 18:3w6 entre rías podrían estar relacionadas con su papel como intermediario en la ruta de biosíntesis del 20:4w6. La mayor cantidad de este ácido graso en el primer periodo de desove en la ría de A Coruña podría reflejar una síntesis de 20:4w6 debido a un menor aporte en la dieta de este ácido graso en este. Esto concuerda con el mayor contenido de 20:4w6 observado en el segundo periodo de desove en esta ría.

6.4.6. Composición de ácidos nucleicos

El contenido de ácidos nucleicos de los ovarios de *M. brachydactyla* desciende a lo largo de la maduración y con el índice gonadosomático, siendo mayor el descenso del ARN que del ADN, igual que se observó en la especie *Penaeus indicus* (Mohamed & Diwan, 1992). Los valores más elevados de ácidos nucleicos se observaron al comienzo de la maduración gonadal, coincidiendo con una alta proliferación de oogonias, y a continuación se produjo un descenso progresivo a consecuencia de los procesos que tienen lugar durante la vitelogénesis. Teniendo en cuenta, que el contenido en ARN está muy relacionado con los periodos de mayor síntesis proteica, el mayor contenido observado en la fase de vitelogénesis primaria podría deberse a la predominancia de la autosíntesis de proteínas que en la fase secundaria de vitelogénesis es sustituida por la heterosíntesis (Rotllant *et al.*, 2007), con el consiguiente descenso del ARN. Esto ha sido observado también en otras especies de crustáceos decápodos (Mohamed & Diwan, 1992; Phiriyangkul *et al.*, 2007). En cuanto el ADN, su drástico descenso durante la maduración del ovario podría estar relacionado con el incremento del volumen del citoplasma de los ovocitos, más que con un descenso real del contenido de ADN en la célula (Mohamed & Diwan, 1992). En cuanto a la relación ARN/ADN, suele usarse frecuentemente como indicador de crecimiento y de la condición de los individuos en organismos marinos (Holland & Hannant, 1973; Buckley, 1984; Chicharro & Chicharro, 1995; Buckley *et al.*, 1999; Dahlhoff, 2004; Caldarone, 2005; Rosa & Nunes, 2005). La tendencia de esta relación, con un primer descenso al comienzo de la maduración (estado I al II) y un incremento considerable alcanzando el doble de su valor en el ovario maduro (estado IV), es similar a lo visto en *Penaeus indicus* (Mohamed & Diwan, 1992), y podría indicar un rápido crecimiento por acumulación de vitelo en los últimos estados de desarrollo. La correlación positiva entre el índice gonadosomático y esta relación ARN/ADN podría también reflejar el crecimiento de los ovocitos, a lo largo de la maduración.

7 CONCLUSIONES

- 1) Los resultados obtenidos demuestran la existencia de diferencias importantes en las características de las puestas que cada hembra puede realizar en un mismo ciclo reproductivo. Estas diferencias podrían ser la consecuencia de un acoplamiento entre la condición fisiológica de las hembras, determinada por las condiciones ambientales cambiantes a lo largo de cada ciclo reproductivo, y la inversión maternal en cada puesta que da lugar a diferencias globales en el peso de la puesta y la fecundidad, así como a diferencias de calidad en términos de las características biométricas y bioquímicas de los embriones.
- 2) La clasificación detallada de los estados de desarrollo embrionario empleada en el presente estudio permite una mejor caracterización de los cambios en la composición bioquímica de los huevos durante la embriogénesis, observándose importantes variaciones dentro de los primeros estados de desarrollo a nivel de diferentes componentes bioquímicos, como los ácidos grasos esenciales.
- 3) Los huevos recién desovados de cultivo tienen un tamaño similar entre puestas sucesivas lo cual contrasta con las variaciones de tamaño observadas en este estado en el medio natural. Esto refleja la influencia de las condiciones ambientales, fundamentalmente de la dieta, en el tamaño de los huevos ya que en condiciones de cultivo la disponibilidad de alimento es óptima.
- 4) La mayor demanda de nutrientes se produce en los dos estados finales de desarrollo embrionario (estado V y VI), como así lo confirma el gasto energético y el consumo de componentes bioquímicos como los lípidos y el carbono. Esto refleja, por un lado, una gran demanda de energía requerida para la eclosión de las larvas y por otro, un consumo mayor de nutrientes para el término de los procesos de desarrollo del embrión y el comienzo de sus movimientos.
- 5) El notable descenso de los componentes bioquímicos del vitelo y del contenido energético de los huevos recién desovados de la cuarta puesta, refleja el desgaste fisiológico de las hembras, después de llevar a cabo varias puestas consecutivas.

- 6) El mayor desarrollo del ovario e índice gonadosomático en el segundo periodo de desoves en la ría de Arousa, refleja una mejor condición nutricional de las hembras en este periodo, confirmando la existencia de estrategias reproductivas diferentes entre distintas puestas del ciclo. Estas diferentes estrategias entre puestas están determinadas por la condición fisiológica de las hembras que redunda en la condición de las gónadas.
- 7) El aumento de la relación C/N y de la relación lípidos/proteínas con el desarrollo gonadal y con el índice gonadosomático indica la acumulación principalmente de lípidos en el ovario en detrimento de reservas de naturaleza proteica para asegurar el éxito del proceso de maduración. Por tanto, el proceso de maduración gonadal en *M. brachydactyla* está basado principalmente en el metabolismo de los lípidos.

8 BIBLIOGRAFÍA

8.BIBLIOGRAFÍA

- Abdu, U., G. Yehezkel & A. Sagi (2000). Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproductive Development* 37: 75-83.
- Abelló, P., G. Guerao, F. Salmerón & J. E. García-Raso (2014). *Maja brachydactyla* (Brachyura: Majidae) in the western Mediterranean. *Marine Biodiversity Records* 7: 1-5.
- Abraham, J. & M. K. Manisseri (2007). Biochemical composition of the ovary and partial characterisation of yolk protein vitellin in *Metapenaeus monoceros* (Fabricius, 1798). *Indian Journal Fisheries* 54 (3): 299-304.
- Adiyodi, R. G. & T. Subramonian (1983). Arthropoda-Crustacea. *Reproductive Biology of Invertebrates* 1: Oogenesis, Oviposition and Oosorption. K. G. Adiyodi and R. G. Adiyodi: 443-495.
- Aiken, D. E. & S. L. Waddy (1980). *Reproductive Biology. The Biology and Management of Lobsters*. J. S. Cobb and B. F. Phillips, Academic Press Vol. I: 215-276.
- Ajmal Khan, S. A. & R. Natarajan (1980). Biochemical variations during the ovarian cycle of estuarine hermit crab *Clibanarius longitarsus*. *Progress in Invertebrate Reproduction and Aquaculture*. T. Subramoniam and S. Varadarajan. University of Madras, Madras: 149-161.
- Alaminos, J. (2011). El centollo. Una oportunidad para la diversificación de la acuicultura. *Pesca y Acuicultura. Estudios e Informes Técnicos*. C. d. A. y. P. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera: 1-54.
- Alava, V. R., A. Kanazawa, S. Teshima, & S. Koshio (1993). Effect of dietary phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids on ovarian development of kuruma prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 345-351.
- Alava, V. R., E. T. Quintiño, J. B. De Pedro, I. M. P. Priolo, Z. G. A. Orozco & M. Wille (2007). Lipids and fatty acids in wild and pond-reared mud crab *Scylla serrata* (Forsskal) during ovarian maturation and spawning. *Aquaculture Research* 38: 1468-1477.
- Albessard, E., P. Mayzaud & J. Cuzin-Roudy (2001). Variation of lipid classes among organs of the Northern krill *Meganyctiphanes norvegica*, with respect to reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 129: 373-390.
- Albessard, E. & P. Mayzaud (2003). Influence of tropho-climatic environment and reproduction on lipid composition of the euphausiid *Meganyctiphanes norvegica* in the Ligurian Sea, the Clyde Sea and the Kattegat. *Marine Ecology Progress Series* 253: 217-232.
- Allen, W. V. (1972). Lipid transport in the dungeness crab, *Cancer magister*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 43 B: 193-207.
- Alvarez, I., M. Gomez-Gesteira, M. DeCastro & J. M. Dias (2008a). Spatio-temporal evolution of the upwelling regime along the western coast of the Iberian Peninsula. *Journal of Geophysical Research* 113: C07020.
- Álvarez, I., M. Gomez-Gesteira, M. deCastro & E. M. Novoa (2008b). Ekman Transport along the Galician Coast (NW, Spain) calculated from QuikSCAT winds. *Journal of Marine Systems* 72: 101-115.
- Alvarez, I., M. Gomez-Gesteira, M. DeCastro & J. M. Dias (2010). Summer upwelling frequency along the western Cantabrian coast from 1967 to 2007. *Journal of Marine Systems* 79: 218-226.
- Alvarez, I., N. Ospina-Alvarez, Y. Pazos, M. DeCastro, P. Bernardez, M. J. Campos, J. L. Gomez-Gesteira, M. T. Alvarez-Ossorio, M. Varela, M. Gomez-Gesteira & R. Prego (2009). A winter upwelling event in the Northern Galician Rias: Frequency and oceanographic implications. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 82: 573-582.
- Amsler, M. O. L. & R. Y. George (1984). Seasonal variation in the biochemical composition of the embryos of *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of Crustacean Biology* 4: 546-553.

- Andrés, M., A. Estévez & G. Rotllant (2007). Growth, survival and biochemical composition of spider crab *Maja brachydactyla* (Balss, 1922) (Decapoda: Majidae) larvae reared under different stocking densities, prey:larva ratios and diets. *Aquaculture* 273: 494-502.
- Andrés, M., A. Estévez, K. Anger & G. Rotllant (2008). Developmental patterns of larval growth in the edible spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 357: 35-40.
- Andrés, M. (2010). El cultiu de la cabra de mar, *Maja brachydactyla*: aspectes zotécnicos, bioquímics i nutricionals del desenvolupament larvari, IRTA Sant Carles de la Ràpita: 226.
- Andrés, M., A. Estévez, F. Hontoria & G. Rotllant (2010a). Differential utilization of biochemical components during larval development of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). *Marine Biology* 157: 2329-2340.
- Andrés, M., A. Estévez, C. G. Simeó & G. Rotllant (2010b). Annual variation in the biochemical composition of newly hatched larvae of *Maja brachydactyla* in captivity. *Aquaculture* 310: 99-105.
- Anger, K. and R. Dawirs (1981). Influence of starvation on the larval development of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Helgolander Meeresunters* 34: 287-311.
- Anger, K. & J. Harms (1990). Elemental (CHN) and proximal biochemical composition of decapod crustacean larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 97 (1): 69-80.
- Anger, K. (1995). The conquest of freshwater and land by marine crabs: adaptations in life-history patterns and larval bioenergetics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1995: 119-145.
- Anger, K. (1998). Patterns of growth and chemical composition in decapod crustacean larvae. *Invertebrate Reproduction and Development* 33: 2-3: 159-176.
- Anger, K. (2001). The biology of decapod crustacean larvae. Lisse, A.A Balkema Publishers : 420.
- Anger, K., S. Thatje, G. Lovrich & J. Calcagno (2003). Larval and early juvenile development of *Paralomis granulosa* reared at different temperatures: Tolerance of cold and food limitation in a lithodid crab from high latitudes. *Marine Ecology Progress Series* 253: 243-251.
- Anger, K. & F. Moreira (2004). Biomass and elemental composition of eggs and larvae of a mangrove crab, *Sesarma rectum* Randall (Decapoda: Sesarmidae) and comparison to a related species with abbreviated larval development. *Scientia Marina* 68 (1): 117-126.
- Anónimo (1993). Report of the study group on Majid crabs. ICES, Shellfish Committe C. M. 1993/K:3.: 18.
- Arcos, F. G., A. M. Ibarra, E. Palacios, C. Vazquez-Boucard & I. S. Racotta (2003). Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. *Aquaculture* 228: 335-349.
- Arts, M. T., R. G. Ackman & B. J. Holub (2001). "Essential fatty acids" in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 122-137.
- Attard, J. & C. Hudon (1987). Embryonic development and energetic investment in egg production in relation to size of female lobster (*Homarus americanus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44 (6): 1157-1164.
- Auel, H., M. Harjes, R. da Rocha, D. Stübing & W. Hagen (2002). Lipid biomarkers indicate different ecological niches and trophic relationships of the Arctic hyperiid amphipods *Themisto abyssorum* and *T. libellula*. *Polar Biology* 25: 374-383.
- Babu, D. E. (1987). Observation on the embryonic development and energy source in the crab, *Xantho bidendatus*. *Marine Biology* 95: 123-127.
- Baklouti, S., A. Derbali, K. Dhieb & O. Jarboui (2013). Reproductive biology of the Mediterranean green crab, *Carcinus aestuarii* Nardo, 1847 (Crustacea: Portunidae), in the Gulf of Gabes (Tunisia, Central Mediterranean). *Cahiers de Biologie Marine* 54: 411-417.
- Balamurugan, P., P. Mariappan & C. Balasundaram (2015). Comparison of fatty acids profile of wild and farm reared freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) brooders for broodstock diet formulation. *African Journal of Biotechnology* 14 (1): 10-16.

- Balss, H. (1922). Crustacea VII: Decapoda brachyura (Oxyrhyncha und Brachyrhyncha) und geographische übersicht über crustacea decapoda. Beiträge zur kenntnis der meeresfauna westafricas. W. Michaelsen, Hamburg: Friederichsen and Co: 69-110.
- Barrento, S., A. Marques, B. Teixeira, P. Vaz-Pires & M. L. Nunes (2009a). Nutritional quality of the edible tissues of European lobster *Homarus gammarus* and American lobster *Homarus americanus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 3645-3652.
- Barrento, S., A. Marques, B. Teixeira, P. Anacleto, P. Vaz-Pires & M. L. Nunes (2009b). Effect of season on the chemical composition and nutritional quality of the edible crab *Cancer pagurus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 10814-10824.
- Barrento, S., A. Marques, B. Teixeira, R. Mendes, N. Bandarra, P. Vaz-Pires & M. L. Nunes (2010). Chemical composition, cholesterol, fatty acid and amino acid in two populations of brown crab *Cancer pagurus*: ecological and human health implications. Journal of Food Composition and Analysis 23 (7): 716-725.
- Bas, C. C., E. D. Spivak & K. Anger (2007). Seasonal and interpopulational variability in fecundity, egg size, and elemental composition (CHN) of eggs and larvae in a grapsoid crab, *Chasmagnathus granulatus*. Helgoland Marine Research 61: 225-237.
- Bas, C. C., E. D. Spivak & K. Anger (2008). Variation in early developmental stages in two populations of an intertidal crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. Helgoland Marine Research 62: 393-401.
- Baum, N.A., D. E. Conklin & E. S. Chang (1990). Effect of dietary lecithin in combination with casein or crab protein on cholesterol uptake and transport in the lobster *Homarus americanus*. Journal of World Aquaculture Society 21: 277-287.
- Bell, T. (1853). A history of the british stalk-eyed Crustacea. Van Voorst, J., London: 464.
- Bell, M. V. & J. R. Dick (1990). The fatty acid composition of phospholipids from the eyes of the northern deepwater prawn *Pandalus borealis*. Biochemical Society Transactions 18: 907-908.
- Bell, J. G. & J. R. Sargent (2003). Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture 218: 491-499.
- Beltz, B. S., X. Helluy, M. Ruchhoeft & L. Gammill (1992). Aspects of the embryology and neural development of the American lobster. Journal of Experimental Zoology 261: 288-297.
- Beltz, B. S., M. F. Tlusty, J. L. Benton & D. C. Sandeman (2007). Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis." Neuroscience Letters 415: 154-158.
- Beninger, P. G., R. W. Elner, T. P. Foyle & P. H. Odense (1988). Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. Journal of Crustacean Biology 8: 322-332.
- Bernárdez, C., J. Freire & E. González-Gurriarán (2000). Feeding of the spider crab *Maja squinado* in rocky subtidal areas of the Ría de Arousa (north-west Spain). Journal of the Marine Biological Association of the UK 80: 95-102.
- Bernárdez, C., E. González-Gurriarán, B. García-Calvo, A. Corgos & J. Freire (2003). Movements of juvenile and adult spider crab (*Maja squinado*) in the Ría da Coruña (N-W Spain). Aquatic telemetry: advances and applications. Proceedings of the Fifth Conference on Fish Telemetry held in Europe, Ustica, Italy, Rome, FAO/COISPA. 2005.
- Bertram, D. F. & R. R. Strathmann (1998). Effect of maternal and larval nutrition on growth and form of planktotrophic larvae. Ecology 79: 315-327.
- Bhavan, P. S., S. Radhakrishnan, C. Seenivasan, R. Shanthi, R. Poongodi & S. Kannan (2010). Proximate composition and profiles of amino acids and fatty acids in the muscle of adult males and females of commercially viable prawn species *Macrobrachium rosenbergii* collected from natural culture environments. International Journal of Biology 2 (2): 107-119.
- Biesiot, P. M. & H. M. Perry (1995). Biochemical composition of the deep-sea red crab *Chaceon quinquedens* (Geryonidae): organic reserves of developing embryos and adults. Marine Biology 124: 407-416.

- Bligh, E. G. & W. J. Dyer (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.
- Boddeke, R. (1982). The occurrence of winter and summer eggs in the brown shrimp (*Crangon crangon*) and the pattern of recruitment. *Netherlands Journal of Sea Research* 16: 151-162.
- Bode, A. & M. Varela (1998). Primary production and phytoplankton in three Galician Rias Altas (NW Spain): seasonal and spatial variability. *Scientia Marina* 62 (4): 319-330.
- Bode, A., M. Varela, B. Casas & N. Gonzalez (2002). Intrusions of eastern North Atlantic central waters and phytoplankton in the north and northwestern Iberian shelf during spring. *Journal of Marine Systems* 36: 197-218.
- Bodin, N., X. Caisey, A. Abarnou, V. Loizeau, D. Latrouite, A.-M. Le Guellec & M. Guillou (2007a). Polychlorinated biphenyl contamination of the spider crab (*Maja brachydactyla*): Influence of physiological and ecological processes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (3): 454-461.
- Bodin, N., A. Abarnou, A.-M. Le Guellec, V. Loizeau & X. Philippon (2007b). Organochlorinated contaminants in decapod crustaceans from the coasts of Brittany and Normandy (France). *Chemosphere* 67 (9): 36-47.
- Bodin, N., F. Le Loch & C. Hily (2007c). Effect of lipid removal on carbon and nitrogen stable isotope ratios in crustacean tissues. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 341: 168-175.
- Botsford, L. W. (1991). Crustacean egg production and fisheries management. Crustacean egg production. A. M. Wenner. Rotterdam, A.A. Balkema: 379-394.
- Bottino, N. R., J. Gennity, M. L. Lilly, E. Simmons & G. Finne (1980). Seasonal and nutritional effects on the fatty acids of three species of shrimp, *Penaeus setiferus*, *P. aztecus* and *P. duorarum*. *Aquaculture* 19 (2): 139-148.
- Botton, M. L., K. Johnson & L. Helleby (1998). Effects of copper and zinc on embryos and larvae of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64: 25-32.
- Boucard, C. G. V., J. Patrois & H. J. Ceccaldi (2004). Exhaustion of lipid reserves in the hepatopancreas of *Fenneropenaeus indicus* broodstock in relation to successive spawnings. *Aquaculture* 236: 523-537.
- Bourdon, R. (1965). Inventaire de la faune marine de Roscoff, Décapodes-Stomatopodes. *Travaux de l'Station Biologique de Roscoff* 16: 1-45.
- Brante, A., M. Fernández, L. Eckerle, F. Mark, H. O. Pörtner & W. Arntz (2003). Reproductive investment in the crab *Cancer setosus* along a latitudinal cline: egg production, embryo losses and embryo ventilation. *Marine Ecology Progress Series* 251: 221-232.
- Brante, A., S. Cifuentes, H. O. Pörtner, W. Arntz & M. Fernández (2004). Latitudinal comparisons of reproductive traits in five brachyuran species along the Chilean coast. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 15-27.
- Bray, W. A., A. L. Lawrence & L. J. Lester (1990). Reproductive performance of ablated *Penaeus stylirostris* fed a soy lecithin supplement. *Journal of the World Aquaculture Society* 21: 41-52.
- Brett, M. T., D. C. Müller-Navarra & J. Persson (2009). Crustacean zooplankton fatty acid composition. *Lipids in Aquatic Ecosystems*, Springer. 31: 115-146.
- Briggs, M. R. P., K. Juancey & J. H. Brown (1988). The cholesterol and lecithin and lecithin requirements of juvenile prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) fed semipurified diets. *Aquaculture* 70: 121-129.
- Brosnan, D. M. (1981). Studies on the biology, ecology and fishery of the spider crab *Maia squinado* Herbst (1768) of the west coast of Ireland, University College Galway, Ireland: 133.
- Brownell, W. N., A. J. Provenzano & M. Martínez (1977). Culture of the West Indian spider crab (*Mithrax spinosissimus*) at Los Roques, Venezuela. *Proceedings of the World Mariculture Society*, 8: 157-168.

- Brown, A. J., J. P. McVey, B. M. Scott, T. D. Williams, B. S. Middleditch & A. L. Lawrence (1980). The maturation and spawning of *Penaeus stylirostris* under controlled laboratory conditions. *Proceedings of the World Mariculture Society*: 488-499.
- Bryant, A. D. & R. G. Hartnoll (1995). Reproductive investment in two spider crabs with different breeding strategies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 188(2): 261-275.
- Buckley, L. J. (1984). RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Marine Biology* 80: 291-298.
- Buckley, L., E. Caldarone & T. L. Ong (1999). RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia* 401: 265-277.
- Cabanas, J. M., M. T. Nunes, M. L. Iglesias, N. González & R. Carballo (1987). Oceanografía de la bahía de La Coruña. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 4: 21-27.
- Cahu, C. & C. Fauvel (1986). Effect of food fatty acids composition of *P. vannamei* broodstock on egg quality. *International Council for the Exploration of the Sea C.M.* 28: 1-8.
- Cahu, C. L., J. C. Guillaume, G. Stephan & L. Chim (1994). Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semipurified diets. *Aquaculture* 126: 159-170.
- Cahu, C. L., G. Cuzon & P. Quazuguel (1995). Effect of highly unsaturated fatty acids, α -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 112: 417-424.
- Calado, R., J. Figueiredo, R. Rosa, M. L. Nunes & L. Narciso (2005). Effects of temperature, density, and diet on development, survival, settlement synchronism, and fatty acid profile of the ornamental shrimp *Lysmata seticaudata*. *Aquaculture* 245: 221-237.
- Calado, R., T. Pimentel, D. F. R. Cleary, G. Dionísio, C. Nunes, T. L. Da Silva, M. T. Dinis & A. Reis (2010). Providing a common diet to different marine decapods does not standardize the fatty acid profiles of their larvae: a warning sign for experimentation using invertebrate larvae produced in captivity. *Marine Biology* 157: 2427-2434.
- Caldarone, E. M. (2005). Estimating growth in haddock larvae *Melanogrammus aeglefinus* from RNA:DNA ratios and water temperature. *Marine Ecology Progress Series* 293: 241-252.
- Camus, P. (1983). Résultats d'une opération de marquage d'araignée de mer (Herbst) adult en baie d'Audierne (Bretagne Sud). *ICES, Shellfish Committee C.M.* K:29:11.
- Carlisle, D. B. (1957). On the hormonal inhibition of moulting in decapod Crustacea. II. The terminal anecdyosis in crabs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 36: 291-307.
- Castille, F. L. & A. L. Lawrence (1989). Relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *Penaeus aztecus* Ives and *Penaeus setiferus* (L.). *Journal of Crustacean Biology* 9 (2): 202-211.
- Cavalli, R. O., P. Lavens & P. Sorgeloos (1999). Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. *Aquaculture* 179 (1-4): 387-402.
- Cavalli, R. O., G. Menschaert, P. Lavens & P. Sorgeloos (2000). Maturation performance, offspring quality and lipid composition of *Macrobrachium rosenbergii* females fed increasing levels of dietary phospholipids. *Aquaculture International* 8: 41-58.
- Cavalli, R. O., M. Tamtin, P. Lavens & P. Sorgeloos (2001). Variations in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation. *Aquaculture* 193 (3-4): 311-324.
- Chandumpai, A., W. Dall & D. M. Smith (1991). Lipid-class composition of organs and tissues of the tiger prawn *Penaeus esculentus* during the moulting cycle and during starvation. *Marine Biology* 108 (2): 235-245.
- Chang, E. S. & J. D. O'Connor (1983). Metabolism transport of carbohydrates and lipids. *The biology of crustacea*. L. H. Mantel. Academic Press, New York, 5: 263-287.
- Chang, E. S. & J. D. O'Connor (1983). Metabolism transport of carbohydrates and lipids. *The biology of crustacea*. L. H. Mantel. Academic Press, New York. 5: 263-287.

- Chansela, P., N. Goto-Inoue, N. Zaima, T. Hayasaka, M. Sroyraya, N. Kornthong, A. Engsusophon, M. Tamtin, Ch. Chaisri, P. Sobhon & M. Setou (2012). Composition and localization of lipids in *Penaeus merguensis* ovaries during the ovarian maturation cycle as revealed by imaging mass spectrometry. PLoS ONE 7 (3): e33154.
- Charniaux-Cotton, H. (1985). Vitellogenesis and its control in Malacostracan Crustacea. American Zoologist 25: 197-206.
- Chatterji, A., Q. Aguir & C. Saldanha (1996). Energy source in developing eggs of the Indian horseshoe crab, *Tachypleus gigas* (Muller). Journal of Aquaculture in the Tropics 11: 271-276.
- Chen, H. Y. (1993). Requirement of marine shrimp, *Penaeus monodon*, juveniles for phosphatidylcholine and cholesterol. Aquaculture 109: 165-176.
- Chen, D.-W., M. Zhang & S. Shrestha (2007). Compositional characteristics and nutritional quality of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Food Chemistry 103 1343–1349.
- Chen, J., H. Wei, H. Shen, Y. Cheng & L. Gong (2010). Lipid content and fatty acid composition in hepatopancreas and ovaries of *Procambrus clarkii* during ovarian maturation. Journal of Fishery Sciences of China: 2010-06.
- Cheng, Y. X., S. L. Yan, W. Wang, Z.F. Shi & Y.J. Tan (1998). Effect of dietary polyunsaturated fatty acids and phospholipid on survival and growth of *Eriocheir sinensis* from megalopa to juvenile. Journal of Fishery Sciences of China 22 (2): 9-15.
- Chícharo, L. M. & M. A. Chícharo (1995). The RNA/DNA ratio as a useful indicator of the nutritional condition in juveniles of *Ruditapes decussatus*. Scientia Marina 59: 95-101.
- Chu, K. H. (1995). Aspects of reproductive biology of the shrimp *Metapenaeus joyneri* from the Zhujiang Estuary, China. Journal of Crustacean Biology 15: 214-219.
- Cifuentes, A. & J. Quiñinao (2000). Composición y vida útil como producto cocido del cangrejo dorado (*Chaceon chilensis*) proveniente del archipiélago de Juan Fernández, Chile. Investigaciones Marinas 28: 195-202.
- Clark, P. F. (1986). The larval stages of *Maja squinado* (Herbst, 1886) (Crustacea: Brachyura: Majidae) reared in the laboratory. Journal of Natural History 20: 825-836.
- Clarke, A. (1977). Lipid class and fatty acid composition of *Chorismus antarcticus* (Pfeffer) (Crustacea: Decapoda) at South Georgia. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 28 (3): 297-314.
- Clarke, A. (1979). Lipid content and composition of the pink shrimp, *Pandalus montagui* (Leach) (Crustacea: Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 38 (1): 1-17.
- Clarke, A. (1982). Lipid synthesis and reproduction in the polar shrimp *Chorismus antarcticus*. Marine Ecology Progress Series 9: 81-90.
- Clarke, A., J. C. Ellis-Evans, M. W. Sanders & L. J. Holmes (1989). Patterns of energy storage in *Pseudoboeckella poppei* (Crustacea, Copepoda) from two contrasting lakes on Signy Island, Antarctica. Hydrobiologia 172: 183-191.
- Clarke, A., J. H. Brown & L. J. Holmes (1990). The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in relation to embryonic development. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 96: 505-511.
- Clarke, A. (1992). Egg size and egg composition in polar shrimps (Caridea: Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 16: 188-203.
- Clarke, A. (1993a). Egg size and egg composition in polar shrimps (Caridea; Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 168(2): 189-203.
- Clarke, A. (1993b). Reproductive trade-off in caridean shrimps. Functional Ecology 7: 411-419.
- Clemmesen, C. (1993). Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. Marine Ecology Progress Series 100: 177-183.
- Clemmesen, C. (1994). The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. Marine Biology 118: 377-382.
- Cobo, V. J. & C. M. Okamori (2008). Fecundity of the spider crab *Mithraculus forceps* (Decapoda, Mithracidae) from the northeastern coast of the state of São Paulo, Brazil. Iheringia Serie Zoologia 98 (1): 84-87.

- Coman, G. J., S. J. Arnold, T. R. Callaghan & N. P. Preston (2007). Effect of two maturation diet combinations on reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 263: 75-83.
- Conklin, D. E., L. R. D'Abramo, C. Brodner & N. Baum (1980). A successful purified diet for the culture of juvenile lobsters: The effect of lecithin. *Aquaculture* 21: 243-249.
- Conklin-Brittain, N. L., E. S. Dierenfeld, R. W. Wranghan, M. Norconk & S. C. Silver (1999). Chemical protein analysis: A comparison of kjeldhal crude protein and total ninhydrin protein from wild, tropical vegetation. *Journal of Chemical Ecology* 25 (12): 2601-2622.
- Copeman, L. A., C. C. Parrish, J. A. Brown & M. Harel (2002). Effects of DHA, EPA and AA on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*); a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210: 185-204.
- Corgos, A. (2004). Estrategia vital, estructura espacial y dinámica poblacional de la centolla, *Maja squinado* (Decapoda: Majidae), Universidad de A Coruña, A Coruña: 312.
- Corgos, A. & J. Freire (2006). Morphometric and gonad maturity in the spider crab *Maja brachydactyla*: a comparison of methods for estimating size at maturity in species with determinate growth. *ICES Journal of marine Science* 63: 851-859.
- Corgos, A., P. Verísimo & J. Freire (2006). Timing and seasonality of the terminal molt and mating migration in the spider crab, *Maja brachydactyla*: evidence of alternative mating strategies. *Journal of Shellfish Research* 25 (2): 577-587.
- Corgos, A., M. P. Sampedro, E. González-Gurriarán & J. Freire (2007). Growth at moult, intermoult period, and moulting seasonality of the spider crab *Maja brachydactyla*: combining information from mark-recapture and experimental studies. *Journal of Crustacean Biology* 27(2): 255-262.
- Corgos, A., C. Bernárdez, M. P. Sampedro, P. Verísimo & J. Freire (2011). Spatial structure of the spider crab, *Maja brachydactyla* population: Evidence of metapopulation structure. *Journal of Sea Research* 66: 9-19.
- Cortés-Jacinto, E., H. Villarreal-Colmenares, R. Civera-Cerecedo & J. Naranjo-Páramo (2004). Effect of dietary protein level on the growth and survival of pre-adult freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) in monosex culture. *Aquaculture Research* 35: 1-71.
- Cosme de Avilés, A. & R. Prego (1995). Características generales de la Ría de La Coruña y su cuenca fluvial. *Monografías de Química Oceanográfica* 2: 25-45.
- Cossins, A. R., M. J. Friedlander & C. L. Prosser (1997). Correlations between behavioral temperature adaptations of goldfish and the viscosity and fatty acid composition of their synaptic membranes. *Journal of Comparative Physiology* 120: 109-121.
- Costa, T. M. & M. L. Negreiros-Fransozo (1996). Fecundidade de *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Decapoda, Portunidae) na região de Ubatuba (SP), Brasil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 39 (2): 393-400.
- Coutteau, P., M. R. Camara & P. Sorgeloos (1996). The effect of different levels and sources of dietary phosphatidylcholine on the growth, survival, stress resistance, and fatty acid composition of postlarval *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 147: 261-273.
- Coutteau, P., I. Gem-den, M. R. Camara, P. Bergot & P. Sorgeloos (1997). Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155 (1-4): 149-164.
- Cuzin-Roudy, J. & F. Buchholz (1999). Ovarian development and spawning in relation to the moult cycle in Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica* (Crustacea: Euphausiacea), along a climatic gradient. *Marine Biology* 133(267-281).
- D'Abramo, L. R., C. E. Conklin & D. E. Baum (1981). Essentiality of dietary phosphatidylcholine for the survival of juvenile lobsters. *The Journal of Nutrition* 111: 425-431.
- D'Abramo, L. R. & S. S. Sheen (1993). Polyunsaturated fatty acid nutrition in juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 115: 63-86.
- D'Abramo, L. R. (1997). Triacylglycerols and fatty acids. *World Aquaculture Society*. L. R. D'Abramo, D. E. Conklin and D. M. Akiyama. Baton Rouge, Louisiana: 71-84.

- Dahlhoff, E. P. (2004). Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications for marine ecological studies. *Annual Review of Physiology* 66: 183–207.
- Dalsgaard, J., M. St. John, G. Kattner, D. Müller-Navarra & W. Hagen (2003). Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*. A. J. Southward, P. A. Tyler, C. M. Young and L. A. Fuiman, Academic Press, 46: 225–340.
- De Grave, S., N. D. Pentcheff, S. T. Ah Yong, T. Y. Chan, K. A. Crandall, P. C. Dworschak, D. L. Felder, R. M. Feldmann, C. H. J. M. Franssen, L. Y. D. Goulding, R. Lemaitre, M. E. Y. Low, J. W. Martín, P. K. L. Ng, C. E. Schweitzer, S. H. Tan, D. Tshudy & R. Wetzer (2009). A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology* 21: 1–109.
- De Sousa, F., M. De Chial & M. Arauz (1988). Estudio de factibilidad de la centolla *Mithrax spinosissimus* (Lamarck), en acuarios de circuito cerrado con agua del Caribe y del Pacífico de Panamá. *Scientia* 3 (1): 49–60.
- DeCastro, M., M. Gomez-Gesteira, I. Álvarez, J. M. Cabanas & R. Prego (2008). Characterization of fall–winter upwelling recurrence along the Galician western coast (NW Spain) from 2000 to 2005: dependence on atmospheric forcing. *Journal of Marine Systems* 72: 145–148.
- Desai, D. V. & A. C. Anil (2002). Comparison of nutritional status of field and laboratory reared *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia: Thoracica) larvae and implication of starvation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 280: 117–134.
- Devi, A. R. S. & M. K. Smija (2013). Reproductive biology of the freshwater crab, *Travancoriana schirnerae* Bott, 1969 (Brachyura: Gecarcinucidae). *Indian Journal of Fisheries* 60 (3): 13–21.
- Dhainaut, A. & M. De Leersnyder (1976). Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocitaire du crabe *Eriocheir sinensis* L. Ovogenèse naturelle. *Archives of Biology* 87: 261–282.
- Diaz, H. (1980). The mole crab *Emerita talpoida* (Say): a case of changing life history pattern. *Ecological Monographs* 50: 437–456.
- Diesel, R. (1989). Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *Journal of Crustacean Biology* 9: 266–277.
- Diesel, R. (1991). Sperm competition and the evolution of mating behavior in Brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae). *Crustacean Sexual Biology*. R. T. Bauer and J. W. Martin. New York, Columbia University Press: 145–163.
- Dinakaran, G. K. & P. Soundarapandian (2009). Biochemical Status of Edible Palaemonid Prawn *Macrobrachium idella idella* (Hilgendorf, 1898). *Advance Journal of Food Science and Technology* 1 (1): 19–26.
- Diniz, G. S., E. Barbarino & S. O. Lourenço (2012). On the chemical profile of marine organisms from coastal subtropical environments: Gross composition and nitrogen-to-protein conversion factors. *Oceanography. M. Marcelli*: 297–320.
- Diniz, G. S., E. Barbarino, J. Oiano-Neto, S. Pacheco & S. O. Lourenço (2014). Proximate composition of marine invertebrates from tropical coastal waters, with emphasis on the relationship between nitrogen and protein contents. *Latin American Journal of Aquatic Research* 42 (2): 332–352.
- Djunaidah, I. S., M. Wille, E. K. Kontara & P. Sorgeloos (2003). Reproductive performance and offspring quality in mud crab (*Scylla paramamosain*) broodstock fed different diets. *Aquaculture International* 11: 3–15.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers & F. Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350–356.
- Dupré, E. (1988). Desarrollo embrionario de la langosta de Juan Fernández *Jasus frontalis* (Decapoda, Macrura, Palinuridae). *Investigaciones Marinas* 16: 49–62.
- Dupré, E. (2003). Reproducción y desarrollo de la langosta espinosa de Juan Fernández, *Jasus frontalis* (H. Milne-Edwards, 1837). *Contribuciones al Estudio de Crustáceos del Pacífico Este* 2: 205–217.
- Dupreez, H. H. & A. McLachlan (1983). Seasonal changes in biochemical composition and energy content of the three-spot swimming crab *Ovalipes punctatus* (De Haan) (Crustacea: Brachyura). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 72: 189–198.

- DuPreez, H. H. & A. McLachlan (1984). Biology of the three spot swimming crab, *Ovalipes punctatus* (De Haan). III. Reproduction, fecundity and egg development. *Crustaceana* 47: 285-297.
- Durán, J., E. Pastor, A. Grau & J. M. Valencia (2011). First results of embryonic development, spawning and larval rearing of the Mediterranean spider crab *Maja squinado* (Herbst) under laboratory conditions, a candidate species for a restocking program. *Aquaculture Research* 43 (12): 1777-1789.
- Eastman-Reks, S. & M. Fingerman (1985). In vitro synthesis of vitelline by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Journal of Experimental Zoology* 233: 111-116.
- Edwards, E. (1977). Spider crabs- a promising new resource. *Fishing news* Oct. 28th: 15-16.
- Edwards, E. (1979). Preliminary results of an investigation on a new fishery for spider crabs (*Maia squinado*) along the south coast of England. ICES, Shellfish Committee. C.M. : K:14:19.
- Edwards, E. (1980). Preliminary results of a tagging experiment on the spider crab (*Maja squinado*) in the English Channel. ICES, Shellfish Committee. C.M.: K:12:17.
- Efford, I. E. (1969). Egg size in the sand crab, *Emerita analoga* (Decapoda, Hippidae). *Crustaceana* 16: 15-26.
- Ellis, C. D., H. Knott, C. L. Daniels, M. J. Witt & D. J. Hodgson (2015). Geographic and environmental drivers of fecundity in the European lobster (*Homarus gammarus*). *ICES Journal of Marine Science*.
- Elnor, R. W. & P. G. Beninger (1995). Multiple reproductive strategies in snow crab, *Chionoecetes opilio*: Physiological pathways and behavioral plasticity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 193: 93-112.
- Emerenciano, M., G. Cuzon, M. Mascaro, M. Arévalo, E. Noreña-Barroso, G. Jerónimo, I. S. Racotta & G. Gaxiola (2012). Reproductive performance, biochemical composition and fatty acid profile of wild-caught and second generation domesticated *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) broodstock. *Aquaculture* 344-349: 194-204.
- Eurenius, L. (1973). An electron microscope study on the developing oocytes of the crab *Cancer pagurus* L. with special reference to yolk formation (Crustacea). *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* 75: 243-254.
- Factor, J. R. (1995). Biology of the lobster *Homarus americanus*. London, Academic Press: 528.
- Fahy, E. (2001). The Maharees spider crab *Maja squinado* fishery in 2000. *Irish Fisheries Investigations* 9: 1-21.
- Falk-Petersen, S., R. R. Gatten, J. R. Sargent & C. C. E. Hopkins (1981). Ecological investigations on the zooplankton community of Balsfjorden, Northern Norway: seasonal changes in lipid class composition of *Meganyctiphanes norvegica* (M. Sars), *Thysanoessa raschii* (M. Sars) and *Thysanoessa inermis* (Krøyer). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 54: 209-224.
- Fang-Yi, L. & C. Ching-Fong (1997). The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemical Physiology* 4: 433-439.
- FAO (2012). Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service FAO, Rome. www.fao.org.
- Fatima, H., Z. Ayub, S. A. Ali & G. Siddiqui (2013). Biochemical composition of the hemolymph, hepatopancreas, ovary, and muscle during ovarian maturation in the penaeid shrimps *Fenneropenaeus merguensis* and *F. penicillatus* (Crustacea: Decapoda). *Turkish Journal of Zoology* 37: 334-347.
- Fermín, G. (1991). Morfometría y fecundidad de *Mithrax caribbaeus* Rathbun, 1920 (Brachyura, Majidae) de la Isla de Cubagua, Estado Nueva Esparta, Universidad de Oriente, Venezuela: 72.
- Fernández de Castillejo, F. & A. Lavin (1982). Contribución al estudio del flujo de agua entrante y saliente en la Ría de Arosa. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 7: 163-180.
- Fernández, L., J. Parapar, E. González-Gurriarán & R. Muiño (1998). Epibiosis and ornamental cover patterns of the spider crab *Maja squinado* on the Galician coast, Northwestern Spain: Influence of behavioral and ecological characteristics of the host. *Journal of Crustacean Biology* 18: 728-737.

- Figueiredo, J. & L. Narciso (2008). Egg volume, energy content and fatty acid profile of *Maja brachydactyla* (Crustacea: Brachyura: Majidae) during embryogenesis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88: 1401-1405.
- Figueiredo, J., G. Penha-Lopes, J. Anto, L. Narciso & J. Lin (2008a). Fecundity, brood loss and egg development through embryogenesis of *Armases cinereum* (Decapoda: Grapsidae). *Marine Biology* 154: 287-294.
- Figueiredo, J., G. Penha-Lopes, J. Anto, L. Narciso & J. Lin (2008b). Potential fertility and egg development (volume, water, lipid, and fatty acid content) through embryogenesis of *Uca rapax* (Decapoda: Brachyura: Ocypodidae). *Journal of Crustacean Biology* 28 (3): 528-533.
- Figueiredo, J., J. Lin, J. Anto & L. Narciso (2012). The consumption of DHA during embryogenesis as an indicative of the need to supply DHA during early larval development: A review. *Journal of Aquaculture Research & Development* 3 (5): 1000140.
- Fischer, S. & S. Thatje (2008). Temperature-induced oviposition in the brachyuran crab *Cancer setosus* along a latitudinal cline: Aquaria experiments and analysis of field-data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 357: 157-164.
- Fischer, S., S. Thatje, M. Graeve, K. Paschke & G. Kattner (2009). Bioenergetics of early life-history stages of the brachyuran crab *Cancer setosus* in response to changes in temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 374: 160–166.
- Fiuza, A. F. G. (1984). Hidrologia e dinamica das aguas costeiras de Portugal, University of Lisbon: 294.
- Fonseca-Larios, M. E. & P. Briones-Fourzan (1998). Fecundity of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) in the Caribbean coast of Mexico. *Bulletin of Marine Science* 63(1): 21-32.
- Fontan, A., V. Valencia, A. Borja & N. Goikoetxea (2008). Oceano-meteorological conditions and coupling in the southeastern Bay of Biscay, for the period 2001–2005: a comparison with the past two decades. *Journal of Marine Systems* 72: 167-177.
- Fox, C., J. H. Brown & M. Briggs (1994). The nutrition of prawns and shrimp in aquaculture—a review of recent research. *Recent Advances in Aquaculture*. J. F. Muir and R. J. Roberts, Blackwell, Oxford. V: 131-206.
- Fraga, F. (1981). Upwelling off the Galician Coast, Northwest Spain. *Coastal Upwelling*. F. A. Richardson. American Geophysical Union, Washington, DC. 176-182.
- Fraser, A. J. (1989). Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46: 1868-1873.
- Freire, J. & E. González-Gurriarán (1998). New approaches to the behavioural ecology of decapod crustaceans using telemetry and electronic tags. *Hydrobiologia* 371-372: 123-132.
- Freire, J., E. González-Gurriarán & C. Bernárdez (1999). Migratory patterns in the spider crab *Maja squinado* using telemetry and electronic tags. ICES, Shellfish Committee. C.M. : AA:14:15. Freire, J., C. Bernárdez, A. Corgos, L. Fernández, E. González-Gurriarán, M. P. Sampedro & P. Verísimo (2002). Management strategies for sustainable invertebrate fisheries in coastal ecosystems of Galicia (NW Spain). *Aquatic Ecology* 36: 41-50.
- Freire, J., S. Carabel, P. Verísimo, C. Bernárdez & L. Fernández (2009). Patterns of juvenile habitat use by the spider crab *Maja brachydactyla* as revealed by stable isotope analyses. *Scientia Marina* 73 (1): 39-49.
- Frouin, R., A. F. G. Fiuza, I. Ambar & T. J. Boyd (1990). Observations of a poleward surface current off the coasts of Portugal and Spain during winter. *Journal of Geophysical Research* 95: 679-691.
- Fukui, Y. (1988). Comparative studies on the life history of the grapsid crabs (Crustacea, Brachyura) inhabiting intertidal cobble and boulder shores. *Seto Marine Biological Laboratory*. 33: 121-162.
- Furota, T. (1988). The ecology of introduced spider crab *Pyromaia tuberculata* in an organically polluted bay. *Benthos Research* 33-34: 79-89.
- Galois, R. G. (1984). Variations in tissue lipid composition during vitellogenesis in the prawn *Penaeus indicus* Milne Edwards. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 84(2): 155-166.
- García-Florez, L. & P. Fernández-Rueda (2000). Reproductive biology of spider crab females *Maja brachydactyla* off the coast of Asturias north-west Spain. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 80: 1071-1076.

- García-Guerrero, M., I. Racotta & H. Villareal (2003a). Variation in lipid, protein, and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology* 23: 1-6.
- García-Guerrero, M., H. Villarreal & I.S. Racotta (2003a). Effect of temperature on lipids, proteins, and carbohydrates levels during development from egg extrusion to juvenile stage of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 135: 147-154.
- García-Guerrero, M. (2009). Proximate biochemical variations in eggs of the prawn *Macrobrachium americanum* (Bate, 1869) during its embryonic development. *Aquaculture Research* 40 (5): 575-581.
- García-Guerrero, M. (2010). Effect of temperature on consumption rate of main yolk components during embryo development of the prawn *Macrobrachium americanum* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Journal of the World Aquaculture Society* 41 (1): 84-92.
- García-Guerrero, M. & P. H. Sandoval (2012). Total protein, lipid, carbohydrate, and water changes of eggs through embryonic development of *Macrobrachium occidentale* Holthuis, 1950 and its relation to morphological changes. *Journal of Crustacean Biology* 32 (5): 769-773.
- Gardner, C. (1997). Effect of size on reproductive output of giant crabs *Pseudocarcinus gigas* (Lamarck): Oziidae. *Marine and Freshwater Research* 48: 581-587.
- Gardner, C. (2001). Composition of eggs in relation to embryonic development and female size in giant crabs (*Pseudocarcinus gigas* (Lamarck)). *Marine Freshwater Research* 52: 333-338.
- Gebauer, P., K. Paschke & K. Anger (2010). Seasonal variation in the nutritional vulnerability of first-stage larval porcelain crab, *Petrolisthes laevigatus* (Anomura: Porcellanidae) in southern Chile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 386: 103-112.
- Gehring, W. R. (1974). Maturation changes in the ovarian lipid spectrum of the pink shrimp *Penaeus duorarum* Burkenroad. *Comparative Biochemical Physiology Part A* 49: 511-524.
- Gimenez, L. & K. Anger (2001). Relationships among salinity, egg size, embryonic development, and larval biomass in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 260 (2): 241-257.
- Gimenez, L. & G. Torres (2002). Larval growth in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*: the importance of salinity experienced during embryonic development, and the initial larval biomass. *Marine Biology* 141: 877-885.
- Gimenez, L. & K. Anger (2003). Larval performance in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, is a consequence of both larval and embryonic experience. *Marine Ecology Progress Series* 249: 251-264.
- Giménez, L., K. Anger & G. Torres (2004). Linking life history traits in successive phases of a complex life cycle: effects of larval biomass on early juvenile development in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*. *Oikos* 104: 570-580.
- Gimenez, L. & K. Anger (2005). Effects of temporary food limitation on survival and development of brachyuran crab larvae. *Journal of Plankton Research* 27 (5): 485-494.
- Giménez, L. (2006). Phenotypic links in complex life cycles: conclusions from studies with decapod crustaceans. *Integrative and Comparative Biology* 46 (5): 615-622.
- Giménez, L. (2010). Relationships between habitat conditions, larval traits, and juvenile performance in a marine invertebrate. *Ecology* 91: 1401-1413.
- Glas, P. S., L. A. Courtney, J. R. Rayburn & W. S. Fisher (1997). Embryonic coat of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Biological Bulletin* 192 (2): 231-231.
- Glencross, B. D. & D. M. Smith (2001). A study of the arachidonic acid requirements of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition* 7: 59-69.
- Gnaiger, E. & G. Bitterlich (1984). Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia* 62: 289-298.
- Gökođlu, N. & P. Yerlikaya (2003). Determination of proximate composition and mineral contents of blue crab (*Callinectes sapidus*) and swim crab (*Portunus pelagicus*) caught off the Gulf of Antalya. *Food Chemistry* 80: 495-498.

- Gómez-Gallego, J. (1971). Estudio de las condiciones oceanográficas en la Ría de Arosa, en verano. Boletín del Instituto Español de Oceanografía 147: 1-39.
- Gómez-Gallego, J. (1975). Estudio de las condiciones oceanográficas en la Ría de Arosa, en invierno. Boletín del Instituto Español de Oceanografía 185: 1-47.
- Gomez-Gesteira, M., C. Moreira, I. Álvarez & M. deCastro (2006). Ekman transport along the Galician coast (NW, Spain) calculated from forecasted winds. Journal of Geophysical Research 111: C10005.
- Gomez-Gesteira, M. (2010). Caracterización oceanográfica de la costa norte gallega Universidad de Vigo: 168.
- Gong, H., A. Lawrence, D. Jiang, F. Castille & D. Gatlin (2000a). Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. Aquaculture 190 (3-4): 305-324.
- Gong, H., A. L. Lawrence, D.H. Jiang & D.M. Gatlin (2000b). Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* II. Active components of soybean lecithin. Aquaculture 190: 325-342.
- González, N. (1975). Composición bioquímica y medio ambiente de *Venerupis decussata* y *Venerupis pullastra* en la Ría del Pasaje, La Coruña. Boletín del Instituto Español de Oceanografía 194: 1-46.
- Gonzalez-Felix, M. L. & M. Perez-Velazquez (2002). Current status of lipid nutrition of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. L. E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés and N. Simoes. Cancún, Quintana Roo, México: 35-45.
- González-Gurriarán, E., L. Fernández, J. Freire, R. Muiño & J. Parapar (1993). Reproduction of the spider crab *Maja squinado* (Brachyura: Majidae) in the southern galician coast (NW, Spain). International Council for the Exploration of the Sea, Shellfish Committee: 1-19.
- González-Gurriarán, E. & J. Freire (1994). Movement patterns and habitat utilization in the spider crab *Maja squinado* (Herbst) (Decapoda, Majidae) measured by ultrasonic telemetry. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 184: 269-291.
- González-Gurriarán, E., J. Freire, J. Parapar, M.P. Sampedro & M. Urcera (1995). Growth at moult and moulting seasonality of the spider crab, *Maja squinado* (Herbst) (Decapoda: Majidae) in experimental conditions: implications for juvenile life history. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 189: 183-203.
- González-Gurriarán, E., L. Fernández, J. Freire & R. Muiño (1996). Reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae) based on the analysis of seminal receptacles." ICES, Shellfish Committee. C.M. : K:29:17.
- Gonzalez-Gurriaran, E., L. Fernandez, J. Freire & R. Muino (1998). Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 220: 269-285.
- González-Gurriarán, E., J. Freire & C. Bernárdez (2002). Migratory patterns in female spider crabs *Maja squinado* using electronic tags and telemetry. Journal of Crustacean Biology 22: 191-197.
- González-Pisani, X., F. G. Dellatorre & L.S. López-Greco (2013). Embryology of the spider crabs *Leurocyclus tuberculosus* (H. Milne-Edwards & Lucas 1842) and *Libinia spinosa* (H. Milne-Edwards 1834) (Brachyura, Majoidea). Zootaxa 3718 (4): 301-316.
- Gould, S. J. (1977). Ontogeny and Phylogeny. Cambridge: Harvard University Press: 501.
- Graeve, M., G. Kattner & D. Piepenburg (1997). Lipids in Arctic benthos: does the fatty acid and alcohol composition reflect feeding and trophic interactions?. Polar Biology 18: 53-61.
- Graeve, M. & I. S. Wehrtmann (2003). Lipid and fatty acid composition of Antarctic shrimp eggs (Decapoda: Caridea). Polar Biology 26: 55-61.
- Grassé, P. P. (1994). Traité de zoologie: Anatomie, systématique, biologie. Tome vii. Crustacés; fascicule i: Morphologie, physiologie, reproduction, systématique. Paris, Masson: 917.
- Guerao, G., E. Pastor, J. Martín, M. Andrés, A. Estévez, A. Grau, J. Duran & G. Rotllant (2008). The larval development of *Maja squinado* and *M. brachydactyla* (Decapoda, Brachyura, Majidae) described from plankton collected and laboratory-reared material. Journal of Natural History 42 (33-34): 2257-2276.

- Guerao, G. & G. Rotllant (2009). Survival and growth of post-settlement juveniles of the spider crab *Maja brachydactyla* (Brachyura: Majoidea) reared under individual culture system. *Aquaculture* 289: 181–184.
- Guerao, G., G. Rotllant & K. Anger (2010). Characterization of larval moulting cycles in *Maja brachydactyla* (Brachyura, Majidae) reared in the laboratory. *Aquaculture* 302 (1-2): 106–111.
- Guerao, G. & G. Rotllant (2010). Development and growth of the early juveniles of the spider crab *Maja squinado* (Brachyura: Majoidea) in an individual culture system. *Aquaculture* 307 (1-2): 105–110.
- Guerao, G., K. B. Andree, C. Frogia, C. G. Simeó & G. Rotllant (2011). Identification of European species of *Maja* (Decapoda: Brachyura: Majidae): RFLP analyses of COI mtDNA and morphological considerations. *Scientia Marina* 75 (1): 129–134.
- Habashy, M. M., K. M. Sharshar & M. M. S. Hassan (2012). Morphological and histological studies on the embryonic development of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Decapoda). *The Journal of Basic and Applied Zoology* 65: 157–165.
- Haché, R., C. J. Pelletier & A. Dumas, (2015). Selected nutrient profiles in first larvae and postlarvae of american lobster *Homarus americanus*. *Aquaculture International* 23 (4): 929–941.
- Hadfield, M. G. & M. F. Strathmann (1996). Variability, flexibility and plasticity in life histories of marine invertebrates. *Oceanologica Acta* 19 (3-4): 323–333.
- Haefner Jr., P. A. & D. H. Spaargaren (1993). Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). I. Weight and volume relationships. *Journal of Crustacean Biology* 13 (3): 523–531.
- Hagen, W., E. S. VanVleet & G. Kattner (1996). Seasonal lipid storage as overwintering strategy of Antarctic krill. *Marine Ecology Progress Series* 134: 85–89.
- Hamid, A., Y. Wardiatno, D. T. F. Batu & E. Riani (2015). Changes in proximate and fatty acids of the eggs during embryo development in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus 1758) at Lasongko Bay, Southeast Sulawesi, Indonesia. *Indian Journal of Science and Technology* 8 (6): 501–509.
- Hammerschmidt, K., A. J. Pemberton, N. K. Michiels & J. D. D. Bishop (2011). Differential maternal allocation following mixed insemination contributes to variation in oocyte size in a sea squirt. *Marine Ecology Progress Series* 442: 123–128.
- Han, T., J. Wang, S. Hu, X. Li, Y. Jiang & C. Wang (2015). Effects of different dietary lipid sources on growth performance and tissue fatty acid composition of juvenile swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 33 (4): 957–965.
- Hancock, M. A., J. M. Hughes & S. E. Bunn (1998). Influence of genetic and environmental factors on egg and clutch sizes among populations of *Paratya australiensis* Kemp (Decapoda: Atyidae) in upland rainforest streams, south-east Queensland. *Oecologia* 115(4): 483–491.
- Harhoglu, M. M., K. Köprücü, A. G. Harhoglu, Y. Ökkes, S. M. Yonar, S. Aydin & T. C. Duran (2015). Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on the nutritional quality of abdomen meat and hepatopancreas in a freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Journal of Food Composition and Analysis* 41: 144–150.
- Harrison, K. E. (1990). The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: A review. *Journal of Shellfish Research* 9: 1–28.
- Harrison, X. A., J. D. Blount, R. Inger, D. R. Norris & S. Bearhop (2011). Carry-over effects as drivers of fitness differences in animals. *Journal of Animal Ecology* 80: 4–18.
- Hartnoll, R. G. (1963). The biology of Manx spider crabs. *Proceedings of the zoological Society of London*.
- Hartnoll, R. G. (1965). The biology of spider crabs: a comparison of British and Jamaican species. *Crustaceana* 9: 1–16.
- Hartnoll, R. G. (1969). Mating in Brachyura. *Crustaceana* 16: 161–181.
- Hartnoll, R. G., M. S. P. Baine, A. Britton, Y. Grandas, J. James, A. Velasco & M.G. Richmond (2007). Reproduction of the black land crab, *Gecarcinus ruricola*, in the San Andres Archipelago, western Caribbean. *Journal of Crustacean Biology* 27: 425–436.

- Hartnoll, R. G., A. C. Broderick, B. J. Godley, S. Musick, M. Pearson, S. A. Stroud & K. E. Saunders (2010). Reproduction in the land crab *Johngarthia lagostoma* on ascension island. *Journal of Crustacean Biology* 30(1): 83-92.
- Hasek, B. E. & D. L. Felder (2005). Biochemical composition of ovary, embryo, and hepatopancreas in the grapsoid crabs *Armases cinereum* and *Sesarma nr. reticulatum* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 140: 455-463.
- Hasek, B. E. & D. L. Felder (2006). Biochemical contents of the ovary and hepatopancreas of *Uca longisignalis* and *Uca nr. minax*. *Scientia Marina* 70 (3): 505-517.
- Hattori, G. Y. & M. A. A. Pinheiro (2003). Fertilidade do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), em Iguape (Sao Paulo, Brasil). *Revista Brasileira de Zoologia* 20: 309-313.
- Haynes, E. & J. F. Karinen (1976). Relation of number of eggs and egg length to carapace width in the brachyuran crabs *Chionoecetes bairdi* and *C. opilio* from the southeastern bering sea and *C. opilio* from the Gulf of St. Lawrence. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33: 2592-2595.
- Haynes, R. & E. D. Barton (1990). A poleward flow along the Atlantic coast of the Iberian peninsula. *Journal of Geophysical Research* 95: 11425-11441.
- Hazel, J. R. & E. E. Williams (1990). The role of alteration in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research* 29: 167-227.
- Helluy, S. M. & B. S. Beltz (1991). Embryonic development of the American lobster (*Homarus americanus*): quantitative staging and characterization of an embryonic molt cycle. *Biological Bulletin* 180: 355-371.
- Henmi, Y. (2003). Trade-off between brood size and brood interval and the evolution of underground incubation in three fiddler crabs (*Uca perplexa*, *U. vocans*, and *U. dussumieri*). *Journal of Crustacean Biology* 23(1): 46-54.
- Heras, H., M. R. Gonzalez-Baró & R. J. Pollero (2000). Lipid and fatty acid composition and energy partitioning during embryo development in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids* 35 (6): 645-651.
- Herbert, D., P. J. Phipps & R. E. Strange (1971). Chemical analysis of microbial cells. *Methods Microbiology* 5 (B): 209-344.
- Herbst, J. F. W. (1788). Versuch einer naturgeschichte der krabben und krebse nebst einer systematischen beschreibung ihrer verschiedenen arten. Berlin and Stralsund: 207-238.
- Hernández-Reyes, I. M., J. L. Palazón-Fernández, J. A. Bolaños-Curvelo & J. E. Hernández (2001). Aspectos reproductivos de *Mithrax forceps* (a. Milne-Edwards, 1875) (Crustacea: Decapoda: Majidae). *Ciencias Marinas* 27 (1): 21-34.
- Herring, P. J. (1973). Depth distribution of the carotenoid pigments and lipids of some oceanic animals. 2. Decapod Crustaceans. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 53: 539-562.
- Herring, P. J. (1974). Size, density and lipid content of some decapod eggs. *Deep-Sea Research* 21: 91-94.
- Herring, P. J. & R. J. Morris (1975). Embryonic metabolism of carotenoid pigments and lipid in species of Acanthephyra (Crustacea: Decapoda). *Proceedings of the Ninth European Marine Biology Symposium*. H. Barnes. Aberdeen University Press, Aberdeen: 299-310.
- Hines, A. H. (1982). Allometric constraints and variables of reproductive effort in brachyuran crabs. *Marine biology* 69: 309-320.
- Hines, A. H. (1986). Larval problems and perspectives in life histories of marine invertebrates. *Bulletin of Marine Science* 39 (2): 506-525.
- Hines, A. H. (1988). Fecundity and reproductive output in two species of deep-sea crabs, *Geryon fenneri* and *G. quinquedens* (Decapoda: Brachyura). *Journal of Crustacean Biology* 8: 557-562.
- Hines, A. H. (1991). Fecundity and reproductive output in nine species of *Cancer crabs* (Crustacea, Brachyura, Cancridae). *Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences* 48(2): 267-275.

- Hines, A. H. (1992). Constraint of reproductive output in brachyuran crabs: pinnotherids test the rule. *American Zoologist* 32: 503-511.
- Hines, A. H., T. G. Wolcott, E. González-Gurriarán, J. L. González-Escalante & J. Freire (1995). Movement patterns and migrations in crabs: telemetruy of juvenile and adult behaviour in *Callinectes sapidus* and *Maja squinado*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 75: 27-42.
- Hinsch, G. W. & V. Cone (1969). Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab, *Libinia emarginata* L. *The Journal of Cell Biology* 40: 336-342.
- Holland, D. L. & P. A. Gabbott (1971). A micro-analytical scheme for the determination of protein, carbohydrate, lipid and RNA levels in marine invertebrate larvae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51: 659-668.
- Holland, D. L. & P. J. Hannant (1973). Addendum to a microanalytical scheme for the biochemical analysis of marine invertebrate larvae. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom* 53: 833-838.
- Holland, D. L. (1978). Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*. D. C. Malins and J. R. Sargent. London: Academic Press: 85-123.
- Holme, M. H., P. C. Southgate & C. Zeng (2007). Survival, development and growth response of mud crab, *Scylla serrata*, megalopae fed semi-purified diets containing various fish oil:corn oil ratios. *Aquaculture* 269: 427-435.
- Huang, J. H., S. G. Jiang, H. Z. Lin, F. L. Zhou & L. Ye (2008). Effects of dietary highly unsaturated fatty acids and astaxanthin on the fecundity and lipid content of pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture Research* 39: 240-251.
- ICES (1993). Report of the study group on majid crabs. ICES, Shellfish Committee C.M. 1993/ K: 3.
- Iglesias, M. L. & M. T. Nunes (1982). Variación anual de algunos parámetros físico-químicos en la Ría de Arosa. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 7: 181-190.
- Iglesias, J., F. J. Sánchez, C. Moxica, L. Fuentes, J. J. Otero & J. L. Pérez (2002). Datos preliminares sobre el cultivo de larvas y juveniles de centolla *Maja squinado* Herbst, 1788 en el Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 25-30.
- Ingle, R. W. (1980). *British crabs*. London, Oxford University Press: 222.
- Ingle, R. W. (1992). Larval stages of northeastern atlantic crabs. An illustrated key. London, Chapman and Hall: 363.
- Ituarte, R. B., E. Spivak & T. A. Luppi (2004). Female reproductive cycle of the Southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). *Scientia Marina* 68 (1): 127-137.
- Ituarte, R. B., C. Bas, T. A. Luppi & E. D. Spivak (2006). Interpopulational differences in the female reproductive cycle of the southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). *Scientia Marina* 70 (4): 709-718.
- Jacobs, J. R., P. M. Biesiot, H. M. Perry & Ch. Trigg (2003). Biochemical composition of embryonic blue crabs *Callinectes sapidus* Rathbun 1896 (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of Mexico. *Bulletin of the Marine Science* 72 (2): 311-324.
- Jaeckle, W. B. (1995). Variation in the size, energy content, and biochemical composition of invertebrates eggs: correlates to the mode of larval development. *Ecology of Marine Invertebrate Larvae*. L. R. McEdwards, Boca raton: CRC Press: 49-77.
- Jalihal, D. R., K. N. Sankolli & S. Shenoy (1993). Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 65 (3): 365-376.
- Jeckel, W. H., J. E. A. De Moreno & V. J. Moreno (1989). Biochemical composition, lipid classes and fatty acids in the ovary of the shrimp *Pleoticus muelleri* bate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 92 (2): 271-276.

- Jiang, K.-J., F.-Y. Zhang, Y. P., L.-L. Jiang, Z. -L. Yu, D. Zhang, D.- D. Sun, L.- J. Gao, Z.- G. Qiao & L.- B. Ma (2014). Amino acid, fatty acid, and metal compositions in edible parts of three cultured economic crabs: *Scylla paramamosain*, *Portunus trituberculatus* and *Eriocheir sinensis*. Journal of Aquatic Food Product Technology 23 (1): 73-86.
- Jones, D. B. (1931). Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. USDA Circ 183: 1-21.
- Jones, M. & M. Simons (1983). Latitudinal variation in reproductive characteristics of a mud crab, *Helice crassa* (Grapsidae). Bulletin of Marine Science 33: 656-670.
- Jones, P. L. & J. H. Obst (2000). Effects of starvation and subsequent refeeding on the size and nutrient content of the hepatopancreas of *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). Journal of Crustacean Biology 20: 431-441.
- Jun-jie, Y., Z. Yun-long, W. Qun, Z. Zhong-liang, H. Xian-cheng, D. Xiao-wei & A. Chuan-guang (2006). Biochemical compositions and digestive enzyme activities during the embryonic development of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 253: 573–582.
- Kanazawa, T., S. Teshima, K. Ono & K. Chlayondeja (1979a). Biosynthesis of fatty acids from acetate in the prawns, *Penaeus monodon* and *Penaeus merguensis*. Memoirs of the Faculty of Fisheries, Kagoshima University 28: 21-26.
- Kanazawa, T., S. Teshima & S. Tokiwa (1979b). Biosynthesis of fatty acids from palmitic acid in the prawn, *Penaeus japonicus*. " Memoirs of the Faculty of Fisheries, Kagoshima University 28: 17-20.
- Kanazawa, A., S. Teshima & M. Sakamoto (1985). Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture 50: 39-49.
- Kattner, G., I. S. Wehrtmann & T. Merck (1994). Interannual variations of lipids and fatty acids during larval development of *Crangon spp.* in the German Bight, North Sea. Comparative Biochemistry and Physiology 107B: 103-110.
- Kattner, G., M. Graeve, J.A. Calcagno, G.A. Lovrich, S. Thatje & K. Anger (2003). Lipid, fatty acid and protein utilization during lecithotrophic larval development of *Lithodes santolla* (Molina) and *Paralomis granulosa* (Jacquinot). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 292: 61-74.
- Kergariou, G. (1971). L'araignée de mer, *Maia squinado* H., sur le littoral de Bretagne. Science et Pêche, Bulletin du Institut de Pêches maritimes 205: 11-19. Kergariou, G. (1974). Régime alimentaire de *Maia squinado*. ICES, Shellfish and benthos committee. C.M.: K:36:36.
- Kergariou, G. (1975). Contribution à l'étude de la reproduction de l'araignée de mer (*Maia squinado* H.). ICES, Shellfish and Benthos Committee C.M.1975/ K: 34.
- Kergariou, G. (1976). Premiers résultats obtenus par marquage de l'araignée de mer, *Maia squinado*, déplacements, mortalité par pêche. ICES, Shellfish and Benthos Committee. C.M.: K:14:19.
- Kergariou, G. & G. Veron (1981). Distribution de l'araignée de mer, *Maia squinado*, sur al pêche hivernale du Golfe Normano Breton. ICES, Shellfish Committee. C.M. : K:32:39.
- Kergariou, G. (1984). L'araignée de mer, *Maia squinado* H., biologie et exploitation. La Pêche Maritime 1279: 575-583.
- Kessel, R. G. (1968). Mechanism of protein yolk synthesis and deposition in crustacean oocytes. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie 89: 17-38.
- Khan, M. A. & A. K. Jafri (1991). Protein and nucleic acid concentration in the muscle of catfish *Clarias batrachus* at different dietary protein level. Asian Fisheries Science 4: 75-84.
- Khoei, J. K., A. A. Bastami & M. Esmailian (2012). The biochemical composition of the eggs blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) in the Persian Gulf coasts, Iran. Middle-East Journal of Scientific Research 12 (7): 915-920.
- Kobayashi, S. & S. Matsuura (1995). Egg development and variation of egg size in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* (DE HAAN). Benthos Research 48: 29-39.
- Koga, T., M. Murai, S. Goshima & S. Poovachiranon (2000). Underground mating in the fiddler crab *Uca tetragonon*: the association between female life history traits and male mating tactics. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 248: 35-52.

- Koop, J. H. E., C. Winkelmann, J. Becker, C. Hellmann & C. Ortmann (2011). Physiological indicators of fitness in benthic invertebrates: a useful measure for ecological health assessment and experimental ecology. *Aquatic Ecology* 45: 547-559.
- Koopman, H. N. & Z. A. Siders (2013). Variation in egg quality in blue crabs, *Callinectes sapidus*, from North Carolina: Does female size matter?. *Journal of Crustacean Biology* 33 (4): 481-487.
- Kozák, P., M. Buřič & T. Polícar (2006). The fecundity, time of egg development and juvenile production in spiny-cheel crayfish (*Orconectes limosus*) under controlled conditions. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 380-381: 1171-1182.
- Krishnan, T. (1989). Yolk utilization, larval development and effects of salinity and starvation on the edible estuarine crab, *Thalamita crenata* (Latreille) reared in the laboratory, Annamalai University India.
- Krol, R. M., W. E. Hawkins & R. M. Overstreet (1992). Reproductive Components. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. F. W. Harrison. New York, Willy-Liss. 10: 295-343.
- Kunisch, M. & K. Anger (1984). Variation in development and growth rates of larval and juvenile spider crabs *Hyas araneus* reared in the laboratory. *Marine Ecology Progress Series* 15: 293-301.
- Kyomo, J. (2000). Intraspecific variation of reproductive strategies of the crab *Sesarma intermedia*: a consequence of habitat variations. *Bulletin of Marine Science* 66 (1): 157-171.
- Lahdes, E. O., T. Farkas & K. K. Lehtonen (2010). Phospholipid characteristics and neutral lipid fatty acid composition related to temperature and nutritional conditions in ecologically important amphipod species from the northern Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 390: 125-133.
- Lang, R. (1973). The ontogenetic development of *Maja squinado* (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with special view on the embryonic nutrition and the development of the interstinum. *Zoologische Jahrbücher. Abtheilung für Anatomie und Ontogenie der Thiere* 90: 389-449.
- Lardies, M. & J. Castilla (2001). Latitudinal variation in the reproductive biology of the commensal crab *Pinnaxodes chilensis* (Decapoda: Pinnotheridae) along the Chilean coast. *Marine Biology* 139(6): 1125-1133.
- Lardies, M. A. & I. S. Wehrtmann (1996). Aspects of the reproductive biology of *Petrolisthes laevis* (Guérin, 1835) (Decapoda, Anomura, Porcellanidae). Part I: Reproductive output and chemical composition of eggs during embryonic development. *Archive of Fishery and Marine Research* 43: 121-135.
- Lardies, M. A. & I. S. Wehrtmann (1997). Egg production in *Betaeus emarginatus* (H. Milne Edwards, 1837) (Decapoda: Alpheididae): fecundity, reproductive output and chemical composition of eggs. *Ophelia* 46 (2): 165-174.
- Latrouite, D. & D. Le Foll (1989). Données sur les migrations des crabes tourteau *Cancer pagurus* et les araignées de mer *Maja squinado*. *Océanis* 15: 133-142.
- Le Foll, D. (1993). Biologie et exploitation de l'araignée de mer *Maja squinado* Herbst en Manche Ouest. *Rapport Interne de la Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer*: 525.
- Leal, M. C., P. N. Pochelon, T. Lopes da Silva, A. Reis, R. Rosa & R. Calado (2013). Variable within-brood maternal provisioning in newly extruded embryos of *Homarus gammarus*. *Marine Biology* 160: 763-772.
- Lebour, M. V. (1927). Studies of the Plymouth Brachyura. I. The rearing of crabs in captivity, with a description of the larval stages of *Inachus dorsettensis*, *Macropodia longirostris* and *Maia squinado*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 14: 795-820.
- Lebour, M. V. (1928). The larval stages of the Plymouth Brachyura. *Proceedings of the Zoological Society of London*: 473-560.
- Lee, R. F. & D. L. Puppione (1978). Serum lipoproteins in the spiny lobster, *Panulirus interruptus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 59 B: 239-243.
- Lee, R. F. (1991). Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. *Advances in Comparative and Environmental Physiology* 7: 187-207.
- Lee, R. F., W. Hagen & G. Kattner (2006). Lipid storage in marine zooplankton. *Marine Ecology Progress Series* 307: 273-306.

- Leme, M. H. A. (2005). Size at sexual maturity of female crabs *Sesarma rectum* Randall (Crustacea: Brachyura) and ontogenetic variation in the abdomen relative growth. *Revista Brasileira de Zoologia* 22 (2): 433-437.
- Lemos, D. & V. N. Phan (2001). Ontogenetic variation in metabolism, biochemical composition and energy content during the early life stages of *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Marine Biology* 138: 985-997.
- Lepage, G. & C. C. Roy (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research* 25: 1391-1396.
- Li, J. Y., Z. L. Guo, X. H. Gan, D. L. Wang, M. F. Zhang & Y. L. Zhao (2011). Effect of different dietary lipid sources on growth and gonad maturation of pre-adult female *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture Nutrition* 17 (4): e853-e860.
- Li, S., Y. Cheng, B. Zhou & A. H. Hines (2012). Changes in biochemical composition of newly spawned eggs, prehatching embryos and newly hatched larvae of the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Journal of Shellfish Research* 31(4): 941-946.
- Li, X., J. Wang, T. Han, S. Hu, Y. Jiang & C. Wang (2014). Effect of dietary phospholipids levels and sources on growth performance, fatty acid composition of the juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture* 430: 166-172.
- Liddy, G. C., S. Kolkovski, M. M. Nelson, P. D. Nichols, B. F. Phillips & G. B. Maguire (2005). The effect of PUFA enriched *Artemia* on growth, survival and lipid composition of western rock lobster, *Panulirus cygnus*, phyllosoma. *Aquaculture Nutrition* 11: 375-384.
- Lilly, M. L. & N. R. Bottino (1981). Identification of arachidonic acid in Gulf of Mexico shrimp and degree of biosynthesis in *Penaeus setiferus*. *Lipids* 16: 871-875.
- Lim, C., H. Ako, Ch. L. Brown & K. Hahn (1997). Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vannamei* fed different sources of dietary lipid. *Aquaculture* 151: 143-153.
- Limbourn, A. J. & P. D. Nichols (2009). Lipid, fatty acid and protein content of late larval to early juvenile stages of the western rock lobster, *Panulirus cygnus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 152: 292-298.
- Litulo, C. (2005). Population structure and reproductive biology of the fiddler crab *Uca inversa* (Hoffman, 1874) (Brachyura: Ocypodidae). *Acta Oecologica* 27(Journal Article): 135-141.
- Liu, Z., X. Wu, W. Wang, B. Yan & Y. Cheng (2014). Size distribution and monthly variation of ovarian development for the female blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* in Beibu Gulf, off south China. *Scientia Marina* 78 (2): 257-268.
- Long, J. S. & L.H. Ervin (2000). Using heteroscedasticity consistent standard errors in the linear regression model. *The American Statistician* 54: 217-224.
- López Greco, L. S. & E. M. Rodríguez (1999). Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). *Cahiers de Biologie Marine* 40: 155-164.
- López Greco, L. S., J. E. Hernández, J. Bolaños, E.M. Rodríguez & G. Hernández (2000). Population features of *Microphrys bicornutus* Latreille, 1825 (Brachyura, Majidae) from Isla Margarita, Venezuela. *Hydrobiologia* 439: 151-159.
- Lubzens, E., M. Khayat, T. Ravid, B. Funkenstein & A. Tietz (1995). Lipoproteins and lipid accumulation within the ovaries of penaeid shrimp. *Israeli Journal of Aquaculture* 47: 185-195.
- Lytle, J. S., T. F. Lytle & J. T. Ogle (1990). Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 89 (314): 287-299.
- Mak, A. S., C. L. Choi, S. H. Tiu, J. H. Hui, J. G. He, S. S. Tobe & S. M. Chan (2005). Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatus*: hepatopancreas-specific expression and farnesoic acid stimulation of vitellogenin gene expression. *Molecular and Reproduction and Development* 70: 288-300.
- Mallet, P., G. Y. Conan & M. Moriyasu (1993). Periodicity of spawning and duration of incubation time for *Chionoecetes opilio* in the Gulf of St. Lawrence. *ICES, Shellfish Committee, 1993/K* 26: 1-19.
- Manivannan, K., M. Sudhakar, R. Murugesan & P. Soundarapandian (2010). Effect of feed on the biochemical composition of commercially important mud crab *Scylla tranquebarica* (Fabricius 1798). *International Journal of Animal and Veterinary Advances* 2 (1): 16-20.

- Manush, S. M., K. Pal, T. Das & S. Mukherjee (2006). The influence of temperatures ranging from 25 to 36 °C on developmental rates, morphometrics and survival of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) embryos. *Aquaculture* 256 (1-4): 529-536.
- Marques, A., B. Teixeira, S. Barrento, P. Anacleto, M. L. Carvalho & M. L. Nunes (2010). Chemical composition of Atlantic spider crab *Maja brachydactyla*: Human health implications. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 230-237.
- Marshall, D. J., R. M. Allen & A. J. Crean (2008). The ecological and evolutionary importance of maternal effects in the sea. *Oceanography and Marine Biology, An Annual Review* 46: 203-250.
- Marshall, D. J. & M. J. Keough (2008). The evolutionary ecology of offspring size in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology* 53: 1-60.
- Martin, J. (1983). Période d'éclosion des larves d'araignée (*Maja squinado*, Herbst) en baie d'Audierne (Bretagne sud) en 1979 et 1980. ICES, Shellfish Committee. C.M.: K:30:10.
- Martin, J. & B. Planque (2006). Variability in the onset of hatching of *Maja brachydactyla* Balss, 1922 (Brachyura: Majidae) in the English Channel in relation to sea temperature. *Invertebrate Reproduction and Development* 49 (3): 143-150.
- Mathavan, S., S. Murugadoss & M. P. Marian (1986). Ontogenetic changes in the composition and energy budget of *Macrobrachium malcolmsonii*. The first Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society Manila Phillipine: 647-650.
- Mayzaud, P., P. Virtue & E. Albessard (1999). Seasonal variations in the lipid and fatty acid composition of the euphausiid *Meganyctiphanes norvegica* from the Ligurian sea. *Marine Ecology Progress Series* 186: 199-210.
- McConaughy, J. R. (1985). Nutrition and larval growth. *Crustacean Issues. Larval Growth*. A. M. Wenner. Balkema A.A., Rotterdam, Netherlands. 2: 127-154.
- Merican, Z. O. & K. F. Shim (1996). Qualitative requirements of essential fatty acids for juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 147: 275-291.
- Meyer, C. G. (1992). Seasonal variation in composition of trap catches of the spider crab *Maja squinado*, Herbst, 1788 in a known inshore nursery area of the south coast of Jersey (British Channel). ICES, Shellfish Committee. C.M.: K:11:16.
- Meyer, C. G. (1993). The biology and fishery of the spider crab (*Maja squinado*) around Jersey (Channel Islands), University of Plymouth: 116.
- Middleditch, B. S., S. R. Missler, H. B. Hines, J. P. McVey, A. Brown & A. L. Lawrence (1980). Metabolic profiles of penaeid shrimp: dietary lipids and ovarian maturation. *Journal of Chromatography* 195: 359-368.
- Middleditch, B. S., S. R. Missler, D. G. Ward, J. P. McVey, A. Brown & A. L. Lawrence (1979). Maturation of penaeid shrimp: dietary fatty acids. *Proceedings of World Mariculture Society*: 472-476.
- Millamena, O. M., J. H. Primavera, R. A. Pudadera & R. V. Caballero (1986). The effects of diets on the reproductive performance of pond-reared *Penaeus monodon* Fabricius broodstock. *Asian Fish Society* 1: 593-596.
- Millamena, O. M. & F. P. Pascual (1990). Tissue lipid content and fatty acid composition of *Penaeus monodon* fabricius broodstock from the wild. *Journal of the World Aquaculture Society* 21: 116-161.
- Mirheydari, S.-M., M. Paolucci, A. Matinfar, M. Soltani, A. Kamali & A. Ousalou (2014). Annual study on ovarian structure of *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) in Arass Dam Lake, Iran. *Global Veterinaria* 12 (6): 850-857.
- Mohamed, K. S. & A. D. Diwan (1992). Biochemical changes in different tissues during yolk synthesis in marine prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian Journal of Marine Sciences* 21: 30-34.
- Moksness, E., M. Belchier, C. Clemmensen, D. Cortés, A. Doan, A. Folkvord, A. García, A. J. Geffen, H. Høie, A. Johannessen, H. de Pontual, T. Ramírez, D. Schnack & D. Sveinsbø (2000). Manual of tools for recruitment studies. Final Report FAIR- CT96-1371: 42.
- Moland, E., E. Moland Olsen & N. Stenseth (2010). Maternal influences on offspring size variation and viability in wild European lobster *Homarus gammarus*. *Marine Ecology Progress Series* 400: 165- 173.

- Montero, P., R. Prego, M. Gómez-Gesteira, R. Neves, J. J. Taboada & V. Pérez-Villar (1997). Aplicación de un modelo 2D al transporte de partículas en la Bahía de A Coruña. En *Procesos biogeoquímicos en sistemas costeros hispano-lusos*. R. P. a. J. M. Fernández. Pontevedra, Excm. Diputación Provincial de Pontevedra: 131-136.
- Morais, S., L. Narciso, R. Calado, M. Nunes & R. Rosa (2002). Lipid dynamics during the embryonic development of *Plesionika martia martia* (Decapoda; Pandalidae), *Palaemon serratus* and *P. elegans* (Decapoda; Palaemonidae): relation to metabolic consumption. *Marine Ecology Progress Series* 242: 195-204.
- Moran, A. L. & J. S. Mcalister (2009). Egg size as a life history character of marine invertebrates: Is it all it's cracked up to be?. *Biological Bulletin* 216: 226-242.
- Morgan, S. G. (1995). Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation. *Ecology of marine invertebrate larvae*. L. McEdward. CRC Press, Boca Raton: 279-321.
- Mori, M., F. Biagi & S. De Ranieri (1998). Fecundity and egg loss during incubation in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) in the North Tyrrhenian Sea. *Journal of Natural History* 32: 1641-1650.
- Mori, M., M. Modena & F. Biagi (2001). Fecundity and egg volume in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) from different depths in the northern Tyrrhenian Sea. *Scientia Marina* 65(2): 111-116.
- Moriyasu, M. & C. Lanteigne (1998). Embryo development and reproductive cycle in the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Crustacea: Majidae), in the southern Gulf of St. Lawrence, Canada. *Canadian Journal of Zoology* 76: 2040-2048.
- Mourete, G., M. Pereiro & A. Rodríguez (1990). Contenido en ácidos grasos de los lípidos totales, polares y neutros en músculo, hepatopáncreas y ovario del crustáceo *Penaeus kerathurus* (Forsk.) antes y después de la puesta. *Aquatic Living Resource* 3: 243-250.
- Mourete, G. and A. Rodríguez (1991). Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Marine Biology* 110 (1): 21-28.
- Mourete, G., A. Medina, S. González & A. Rodríguez (1994). Changes in lipid class and fatty acid contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodiidae) during maturation. *Marine Biology* 121: 187-197.
- Mourete, G. (1996). In vitro metabolism of 4c-polyunsaturated fatty acids in midgut gland and ovary cells from *Penaeus kerathurus* Forskal at the beginning of sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 115 (2): 255-266.
- Müller, Y. M. R., C. Pacheco, M. S. Simoes-Costa, D. Ammar & E. M. Nazari (2007). Morphology and chronology of embryonic development in *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). *Invertebrate Reproduction and Development* 50 (2): 67-74.
- Munro, D. & D. W. Thomas (2004). The role of polyunsaturated fatty acids in the expression of torpor by mammals: a review. *Zoology* 107: 29-48.
- Muriana, F. J. G., V. Ruiz-Gutierrez, M. L. Gallardo-Guerrero & M. I. Minguez-Mosquera (1993). A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn, *Penaeus japonicus*. *The Journal of Biochemistry* 114: 223-229.
- Murphy, N. P. & C. M. Austin (2005). Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. *Zoologica Scripta* 34: 187-197.
- Naessens, E., P. Lavens, L. Gomez, C. L. Browdy, K. McGovernHopkins, A. W. Spencer, D. Kawahigashi & P. Sorgeloos (1997). Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed Artemia biomass preparations. *Aquaculture* 155: 87-101.
- Nagao, J., H. Munehara & K. Shimazaki (1999). Embryonic development of the hair crab *Erimacrus isenbecki*. *Journal of Crustacean Biology* 19: 77-83.
- Narciso, L. & S. Morais (2001). Fatty Acid Profile of *Palaemon serratus* (Palaemonidae) Eggs and Larvae during Embryonic and Larval Development Using Different Live Diets. *Journal of Crustacean Biology* 21(3): 566-574.

- Nates, S. F. & C. L. McKenney Jr (2000). Ontogenetic changes in biochemical composition during larval and early postlarval development of *Lepidophthalmus louisianensis*, a ghost shrimp with abbreviated development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 127(Journal Article): 459-468.
- Nazari, E., Y. Rauh & D. Ammar (2000). Embryonic development of *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901)(Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. *Crustaceana* 73: 143-152.
- Nazari, E. M., M. S. Simões-Costa, Y. M. R. Müller, D. Ammar & M. Dias (2003). Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiuna* and *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology* 23 (4): 862-868.
- Neumann, V. (1996). Comparative investigations on the systematics and taxonomy of european *Maja species* (Decapoda, Brachyura, Majidae). *Crustaceana* 69: 821-852.
- Neumann, V. (1998). A review of the *Maja squinado* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) species-complex with a key to the eastern Atlantic and Mediterranean species of the genus. *Journal of Natural History* 32 (10-11): 1667-1684.
- New, M. B. (1976). A review of dietary studies with shrimps and prawns. *Aquaculture* 9: 101-144.
- Ng, P. K. L., D. Guinot & P. J. F. Davie (2008). Systema brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. *Raffles Bulletin of Zoology* 17: 1-286.
- Nicolau, C. F., A. A. Nascimento, C. Machado-Santos, A. Sales & L. M. Y. Oshiro (2012). Gonads of males and females of the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Grapsidae: Brachyura: Decapoda): a histological and histochemical view. *Acta Zoologica* 93 (2): 222-230.
- Niu, C., S. Lee & N. Goshima (2003). Effect of temperature on food consumption, growth and oxygen consumption of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii postlarvae*. *Aquaculture Research* 34: 501-506.
- O'Connor, J. D. & L. I. Gilbert (1968). Alterations in lipid metabolism associated with premolt activity in a land crab and fresh-water crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology*: 889-904.
- Odinetz-Collart, O. & H. Rabelo (1996). Variation in egg size of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology* 16: 684-688.
- Oh, C. & R. G. Hartnoll (1999). Brood loss during incubation in *Philocheiras trispinosus* (Decapoda) in Port Erin Bay, Isle of Man. *Journal of Crustacean Biology* 19: 467-476.
- Okamori, C. M. & V. J. Cobo (2003). Fecundity of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* in the southern Brazilian coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83: 979-980.
- Oliveira, G. T., C. Hack, M. Almerão, G. Bond-Buckup & B. K. Dutra (2011). Tissue composition and haemolymphatic metabolites during gonadal development in *Aegla platensis* (Crustacea, Decapoda) maintained in experimental culture. *Revista Brasileira de Biociências* 9 (1): 64-71.
- Otto, L. (1975). Oceanography of the Ría de Arosa (NW Spain), Mededelingen en Verhandelingen: 210.
- Otto, R. S., R. A. MacIntosh & P. A. Cumiskey (1989). Fecundity and other reproductive parameters of female red king crab (*Paralithodes camtschatica*) in Bristol Bay and Norton Sound, Alaska.
- Ouellet, P., C. T. Taggart & K. T. Frank (1992). Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 368-378.
- Ouellet, P. & J. Allard (2002). Seasonal and interannual variability in larval lobster *Homarus americanus* size, growth and condition in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. *Marine Ecology Progress Series* 230: 241-251.
- Ouellet, P. & F. Plante (2004). An investigation of the sources of variability in american lobster (*Homarus americanus*) eggs and larvae: female size and reproductive status, and interannual and interpopulation comparisons. *Journal of Crustacean Biology* 24(3): 481-495.
- Paibulkichakul, C., S. Piyatiratitivorakul, P. Kittakoop, V. Viyakarn, A. Fast & P. Menasveta (1998). Optimal dietary level of lecithin and cholesterol for black tiger prawn *Penaeus monodon* larvae and postlarvae. *Aquaculture* 176: 273-281.
- Palacios, E., A. M. Ibarra & I. S. Racotta (2000). Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 185 (3-4): 353-371.

- Palacios, E., I. S. Racotta, H. Heras, Y. Marty, J. Moal & J.-F. Samain (2001). Relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture International* 9: 531–543.
- Palma, J., M. Correia & J. P. Andrade (2008). Usefulness of flat bottom tanks on the settlement of spider crab (*Maja squinado*, Herbst) larvae. *Aquaculture Research* 39: 1005–1008.
- Pan, M., G. J. Pierce, C. O. Cunningham & S. J. Hay (2011). Spatiotemporal coupling/decoupling of planktonic larvae and benthic settlement in decapods in the Scottish east coast. *Marine Biology* 158: 31–46.
- Pandian, T. J. (1967). Changes in chemical composition and caloric content of developing eggs of the shrimp *Crangon crangon*. *Helgoland Marine Research* 16: 216–224.
- Pandian, T. J. (1970). Ecophysiological studies on the developing egg and embryos of the European lobster *Homarus gammarus*. *Marine Biology* 5: 154–167.
- Parakarma, M. G. I. S., K. D. Rawat, G. Venkateshwarlu & A. K. Reddy (2009). Feeding vitamins, antioxidants and cod liver oil enriched formulated feed influences the growth, survival and fatty acid composition of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) postlarvae. *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences* 14: 59–74.
- Parapar, J., L. Fernández, E. González-Gurriarán & R. Muiño (1997). Epibiosis and masking material in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Cahiers de Biologie Marine* 38: 221–234.
- Parslow-Williams, P. J., A. R. J. Atkinson & A. C. Taylor (2001). Nucleic acids as indicators of nutritional condition in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Marine Ecology Progress Series* 211: 235–243.
- Paschke, K. (1998). Untersuchungen zum energiestoffwechsel während der embryonalentwicklung der Nordsee-Garnele *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758) (Decapoda: Caridea). Dissertation, University of Hamburg, Germany.
- Paschke, K. A., P. Gebauer, F. Buchholz & K. Anger (2004). Seasonal variation in starvation resistance of early larval North Sea shrimp *Crangon crangon* (Decapoda: Crangonidae). *Marine Ecology Progress Series* 279: 183–191.
- Pechenik, J. A. (2006). Larval experience and latent effects: metamorphosis is not a new beginning. *Integrative and Comparative Biology* 46: 323–333.
- Peixoto, S., W. Wasielesky, R. C. Martino, A. Milach, R. Soares & R. O. Cavalli (2008). Comparison of reproductive output, offspring quality, ovarian histology and fatty acid composition between similarly-sized wild and domesticated *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture* 285: 201–206.
- Perkins, H. C. (1972). Developmental rates at various temperatures of embryos of the northern lobster (*Homarus americanus* Milne–Edwards). *Fishery Bulletin* 70: 95–99.
- Petersen, S. (1995). The embryonic development of *Hyas araneus* L. (Decapoda, Majidae): effects of temperature. *Sarsia* 80 (3): 193–198.
- Petersen, S. & K. Anger (1997). Chemical and physiological changes during the embryonic development of the spider crab, *Hyas araneus* L. (Decapoda: Majidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 117 (2): 299–306.
- Phiriyangkul, P., P. Puengyam, I. B. Jakobsen & P. Utarabhand (2007). Dynamics of vitellogenin mRNA expression during vitellogenesis in the banana shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis* using real-time PCR. *Molecular and reproduction and development* 74: 1198–1207.
- Pillai, C. K. & T. Subramoniam (1985). Yolk utilisation as an adaptive strategy of terrestriation in the freshwater crab *Paratelphusa hydrodromus* (Herbst). *Physiological Zoology* 58: 445–457.
- Pillay, K. K. & N. B. Nair (1971). The annual reproductive cycles of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus* and *Metapenaeus affinis* (Decapoda, Crustacea) from the south-west coast of India. *Marine Biology* 11: 152–166.
- Pillay, K. K. and N. B. Nair (1973). Observations on the biochemical changes in gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus*, and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) during the reproductive cycle. *Marine Biology* 18: 167–198.

- Pinheiro, J.C. & D. M. Bates (2000). Mixed-effects models in S and S-PLUS, Springer, New York.
- Pinheiro, M. A. A. & A. Franzoso (1993). Relative growth of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Brachyura, Portunidae), near Ubatuba, state of São Paulo, Brazil. *Crustaceana* 65: 377-389.
- Pinheiro, M. A. A. & G. Y. Hattori (2002). Embriologia do siri *Arenaeus cribrarius* (Lamarck)(Crustacea, Brachyura, Portunidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 19 (2): 571-583.
- Pinheiro, M. A. A. & G. Y. Hattori (2003). Embryology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). *Journal of Crustacean Biology* 23: 729-737.
- Pochelon, P. N. (2011). Embyonic and larval ecology and biochemistry of offshore decapods, Universidade de Aveiro: 177.
- Pollock, D. E. (1997). Egg production and life-history strategies in some clawed and spiny lobster populations. *Bulletin of Marine Science* 61 (1): 97-109.
- Pond, D., R. Harris, R. Head & D. Harbour (1996). Environmental and nutritional factors determining seasonal variability in the fecundity and egg viability of *Calanus helgolandicus* in coastal waters off Plymouth, UK. *Marine Ecology Progress Series* 143: 45-63.
- Ponnuchamy, R., S. Ayyappan, R. Ravichandran & S. Katare (1979). Yolk and copper utilization during embryogenesis of the fresh water prawn *Cardina nilobica*. *Proceedings of the Indian Academic of Science* 88: 353-362.
- Portella, C. G., L. S. Sant'Ana & W. C. Valenti (2013). Chemical composition and fatty acid contents in farmed freshwater prawns. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 48 (8): 1115-1118.
- Prego, R., D. Guzman-Zuñiga, M. Varela, M. DeCastro & M. Gómez-Gesteira (2007). Consequences of winter upwelling events on biogeochemical and phytoplankton patterns in a western Galician Ria (NW Iberian Peninsula). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73: 409-422.
- Quackenbush, L. S. (1991). Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimps. *Frontiers of Shrimp Research*. P. F. De Loach, W. J. Dougherty and M. A. Davidson. Elsevier, Amsterdam: 125-140.
- Querijero, B. V. L., S. Teshima, S. Koshio & S. Ishikawa (1997). Utilization of monounsaturated fatty acid (18:1n-9, oleic acid) by freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 3: 127-139.
- Quinitio, E. T. & O. M. Millamena (1992). Ovarian changes and female-specific protein levels during sexual maturation of the white shrimp *Penaeus indicus*. *Israeli Journal of Aquaculture* 44 (1): 7-12.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL <http://www.R-project.org>.
- Rabalais, N. N. (1991). Egg production in crabs with abbreviated development. *Crustacean Issues* 7. *Crustacean Egg Production*. A. Wenner and A. Kuris, Rotterdam, Brookfield : A. A. Balkema. 7: 217-234.
- Racotta, I. S., E. Palacios & A. M. Ibarra, (2003). Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227: 107-130.
- Rainuzzo, J. R., K. I. Reitan & Y. Olsen (1997). The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155: 103-116.
- Rajendran, N., Y. Suwa & Y. Urushigawa (1993). Distribution of phospholipid ester-linked fatty acids biomarkers for bacteria in the sediment of Ise Bay. *Marine Chemistry* 43: 39-56.
- Ramirez Llodra, E. R. (2002). Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology* 43: 87-170.
- Rao, N. C. H., C. Ponnuchamy, K. Shakuntala & S. R. Reddy (1981). Fecundity and energetics of embryonic metabolism of *Caridina weberi* (de Mann) (Decapoda: Atyidae). *Journal of Invertebrate Reproduction* 3: 75-85.
- Rasheed, S. & J. Mustaqim (2010). Size at sexual maturity, breeding season and fecundity of three-spot swimming crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst, 1783) (Decapoda, Brachyura, Portunidae) occurring in the coastal waters of Karachi, Pakistan. *Fisheries Research* 103: 56-62.

- Ravichandran, S., G. Rameshkumar, S. Velankanni & T. T. Ajithkumar (2009). Variation in lipid concentration of the crab *Portunus sanguinolentus* at different developmental stages. *Middle-East Journal of Scientific Research* 4 (3): 175-179.
- Ravid, T., A. Tietz, M. Khaya, E. Boehm, R. Michelis & E. Lubzens (1999). Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Journal of Experimental Biology* 202 (13): 1819-1829.
- Read, G. H. L. & M. S. Caulton (1980). Changes in mass and chemical composition during the moult cycle and ovarian development in immature and mature *Penaeus indicus* Milne Edwards. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 66 (3): 431-437.
- Reppond, K., L. Rugolo & A. C. M. De Oliveira (2008). Change in biochemical composition during development of snow crab, *Chionoecetes opilio*, embryos. *Journal of Crustacean Biology* 28(3): 519-527.
- Revathi, P., P. Iyapparaj, N. Munuswamy & M. Krishnan (2012). Vitellogenesis during the ovarian development in freshwater female prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *International Journal of Aquatic Science* 3 (2): 13-27.
- Reyes-Avalos, W. E., H. Luján-Monja, L. Moreno-Fernández & M. Pesantes-Murillo (2009). Characterization embryonic stages of *Cryphiops caementarius* (Crustacea, Palaemonidae). *Sciend* 12 (1): 55-67.
- Ribeiro, K., I. B. Franceschini-Vicentini, L. P. Papa, M. B. New & W. C. Valenti (2011). Effect of polyunsaturated fatty acids on the fecundity of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). *Aquaculture Research*: 1-8.
- Riley, L. G. & B. Tsukimura (1998). Yolk protein synthesis in the riceland tadpole shrimp, *Triops longicaudatus*, measured by in vitro incorporation of 3H-leucine. *Journal of Experimental Zoology* 281: 238-247.
- Ríos Barja, F. J. & F. Rodríguez Lestegas (1992). Os ríos galegos. Consello da Cultura Galega: 316.
- Ritar, A. J., G. A. Dunstan, B. J. Crear & M. R. Brown (2003). Biochemical composition during growth and starvation of early larval stages of cultured spiny lobster (*Jasus edwardsii*) phyllosoma. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 136: 353–370.
- Rodhouse, D. M. (1984). Experimental fishing for the spider crab, *Maja squinado*: sea and laboratory trials. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 64: 251-259.
- Rodríguez-García, O., V. Castañeda-Fernández de Lara, C. Rodríguez-Jaramillo & E. Serviere-Zaragoza (2015). Nutritional condition and gonad development of juvenile and subadult California spiny lobster *Panulirus interruptus* in two habitats. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 50 (2): 261-270.
- Rodríguez-González, H. (2001). Effect of protein and lipids content in the gonad development of females of the freshwater Australian crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens). *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*: 78.
- Rodríguez-González, H., A. Hernández-Llama, H. Villareal, P. E. Saucedo, M. García-Ulloa & C. Rodríguez-Jaramillo (2006). Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the Gonadosomatic Index at first maturation. *Aquaculture* 254: 637–645.
- Romero, M. C., G. A. Lovrich & F. Tapella (2006). Seasonal changes in dry mass and energetic content of *Munida subrugosa* (Crustacea:Decapoda) in the beagle channel, Argentina. *Journal of Shellfish Research* 25 (1): 101-106.
- Rosa, R. & M. L. Nunes (2002). Biochemical changes during the reproductive cycle of the deep-sea decapod *Nephrops norvegicus* on the south coast of Portugal. *Marine Biology* 141: 1001-1009.
- Rosa, R. & M. L. Nunes (2003a). Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris*, and *Nephrops norvegicus* (Decapoda) from the portuguese south coast. *Crustaceana* 75 (9): 1095-1105.
- Rosa, R. & M. L. Nunes (2003b). Tissue biochemical composition in relation to the reproductive cycle of deep-sea decapod *Aristeus antennatus* in the Portuguese south coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83: 963-970.

- Rosa, R. & M. L. Nunes (2003c). Seasonal changes in nucleic acids, amino acids and protein content in juvenile Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *Marine Biology* 143: 565-572.
- Rosa, R., S. Morais, R. Calado, L. Narciso & M. L. Nunes (2003). Biochemical changes during the embryonic development of Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture* 221: 507-522.
- Rosa, R. & M. L. Nunes (2005). Seasonal patterns of nucleic acid concentrations and amino acid profiles of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda): relation to growth and nutritional condition. *Hydrobiologia* 537(1-3): 207-216.
- Rosa, R., R. Calado, A. M. Andrade, L. Narciso & M. L. Nunes (2005). Changes in amino acids and lipids during embryogenesis of European lobster, *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 140: 241-249.
- Rosa, R., R. Calado, L. Narciso & M. L. Nunes (2007). Embryogenesis of decapod crustaceans with different life history traits, feeding ecologies and habitats: a fatty acid approach. *Marine Biology* 151: 935-947.
- Rosón, G., F. F. Pérez, X. A. Álvarez-Salgado & A. F. Ríos (1991). Flujos de los aportes de agua continental a la Ría de Arousa. *Sciencia marina* 55: 583-589.
- Rosón, G., F. F. Pérez, X. A. Álvarez-Salgado & F. G. Figueira (1995). Variation of both thermohaline and chemical properties in an estuarine upwelling ecosystem: Ría de Arousa. I. Time evolution. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 41: 195-213.
- Rotllant, G., M. Charmantier-Daures, Guy Charmantier, K. Anger & F. Sardá (2001). Effects of diet on *Nephrops norvegicus* (L.) larval and postlarval development, growth, and elemental composition. *Journal of Shellfish Research* 20 (1): 347-352.
- Rotllant, G., K. Anger, M. Durfort & F. Sardá (2004). Elemental and biochemical composition of *Nephrops norvegicus* (Linnaeus 1758) larvae from the Mediterranean and Irish Seas. *Helgoland Marine Research* 58(3): 206-210.
- Rotllant, G., E. Ribes, J. B. Company & M. Durfort (2005). The ovarian maturation cycle of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758) (Crustacea, Decapoda) from the western Mediterranean Sea. *Invertebrate Reproduction and Development* 48 (1-3): 161-169.
- Rotllant, G., E. González-Gurriarán, L. Fernández, K. Benhalim & E. Ribes (2007). Ovarian maturation of the multi-spawning spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae) with special reference. *Marine Biology* 152: 383-394.
- Rotllant, G., C. G. Simeo, G. Guerao, M. Sastre, D. F. R. Cleary, R. Calado & A. Estevez (2013a). Interannual variability in the biochemical composition of newly hatched larvae of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda, Majidae). *Marine Ecology*: 1-10.
- Rotllant, G., A. Roque, M. Sole & E. Gisbert (2013b). Assessment of the effects of confinement in the spider crab *Maja brachydactyla* Blass, 1922 broodstock. *Aquaculture Research* 44: 412-426.
- Roustaian, P. & M. Kamarudin (2001). Biochemical changes in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) during larval development. *Journal of the World Aquaculture Society* 31: 53-59.
- Roy, L. A., D. A. Davis & I. P. Saoud (2006). Effects of lecithin and cholesterol supplementation to practical diets for *Litopenaeus vannamei* reared in low salinity waters. *Aquaculture* 257: 446-452.
- Saether, O., T. E. Ellingsen & V. Mohr (1986). Lipids of North Atlantic krill. *Journal of Lipid Research* 27: 274-285.
- Sagi, A., M. Rise, K. Isam & A. Shoshana (1995). Carotenoids and their derivatives in organs of the maturing female crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology* 112 (2): 309-313.
- Saigusa, M. (1992). Observations on egg hatching in the estuarine crab *Sesarma haematocheir*. *Pacific Science* 46: 484-494.
- Sainte-Marie, B. (1993). Reproductive cycle and fecundity of primiparous and multiparous female snow crab, *Chionoecetes opilio*, in the northwest Gulf of Saint Lawrence. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences* 50: 2147-2156.

- Sainte-Marie, B. & G. A. Lovrich (1994). Delivery and storage of sperm at first mating of female *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae) in relation to size and morphometric maturity of male parent. *Journal of Crustacean Biology* 14: 508-521.
- Sainte-Marie, B. & C. Carrière (1995). Fertilization of the second clutch of eggs of snow crab, *Chionoecetes opilio*, from females mated once or twice after their molt to maturity. *Fishery Bulletin* 93(4): 760-764.
- Salmon, M. & M. K. Kettler (1987). The importance of behavioral and biochemical differences between fiddler crab taxa, with special reference to *Uca rapax* (Smith) and *U. virens* (Salmon & Atsides). *Contributions in Marine Science* 30: 63-76.
- Salonen, K., J. Sarvala, I. Hakala & M.L. Viljanen (1976). The relation of energy and organic carbon in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 21 (5): 724-730.
- Sampedro, M. P., E. González-Gurriarán, J. Freire & R. Muiño (1999). Morphometry and sexual maturity in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in Galicia, Spain. *Journal of Crustacean Biology* 19 (3): 578-592.
- Sampedro, M. P. (2001). Crecimiento de la centolla, *Maja squinado* (Herbst, 1788) (Decapoda: Majidae), Universidade da Coruña: 163.
- Sampedro, M. P., E. González-Gurriarán & J. Freire (2003). Moulting cycle and growth of *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in coastal habitats of Galicia, north-west Spain." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83: 995-1005.
- Sampedro, M. P. & E. González-Gurriarán (2004). Aggregating behaviour of the spider crab *Maja squinado* in shallow waters. *Journal of Crustacean Biology* 24 (1): 168-177.
- Samuel, M. J., T. Kannupandi & P. Soundarapandian (1998). Fatty acid profile during embryonic development of the cultivable freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards). *Indian Journal of Fisheries* 45 (2): 141-148.
- Samuel, N. J. & P. Soundarapandian (2009). Embryonic development of commercially important portunid crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst). *International Journal of Animal and Veterinary Advances* 1 (2): 32-38.
- Samuel, N. J. & P. Soundarapandian (2010). Embryology of commercially important portunid crab *Scylla serrata* (Forsk.). *Asian Journal of Experimental Biological Sciences* 1 (1): 178-182.
- Samyal, A., Y. Bakhtiyar, A. Verma & S. Langer (2011). Studies on the seasonal variation in lipid composition of muscles, hepatopancreas and ovary of freshwater prawn, *Macrobrachium dayanum* (Henderson) during reproductive cycle. *Advance Journal of Food Science and Technology* 3 (3): 160-164.
- Sandeman, R. & D. Sandeman (1991). Stages in the development of the embryo of the fresh water crayfish *Cherax destructor*. *Roux's Archives of Developmental Biology* 200: 27-37.
- Santos, A. M., M. F. Borges & S. Groom (2001). Sardine and horse mackerel recruitment and upwelling off Portugal. *ICES Journal of Marine Science* 58: 589-596.
- Sargent, J. R. & S. Falk-Petersen (1981). Ecological investigations on the zooplankton community of Balsfjorden, northern Norway: lipids and fatty acids in *Meganyctiphanes norvegica*, *Thysanoessa raschii* and *T. inermis* during mid-winter. *Marine Biology* 62: 131-137.
- Sargent, J. R., R. J. Henderson & D. R. Tocher (1989). The lipids. *Fish nutrition*. J. E. Halver. Academic, New York: 153-218.
- Sargent, J., L. A. McEvoy, A. Estevez, G. Bell, M. Bell, J. Henderson & D. Tocher (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179: 217-229.
- Sarojini, R., S. Sambasiva Rao, K. Jayalakshmi & R. Nagabhushanam (1989). Effect of PG F1a on ovarian maturation in a penaeid prawn *Metapenaeus affinis*. *Journal of Zoological Research* 2: 7-11.
- Sasaki, G. C., J. M. Capuzz & P. Biesiot (1986). Nutritional and bioenergetics considerations in the development of the American lobster *Homarus americanus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43: 2311-2319.
- Sastry, A. N. (1983). Pelagic larval ecology and development. *The biology of crustacea. Behavior and Ecology*. F. J. Vernberg and W. B. Vernberg. New York, Academic Press. 7: 213-225.

- Schejter, L. & E. Spivak (2005). Morphometry, sexual maturity, fecundity and epibiosis of the South American spider crab *Libinia emarginata* (Brachyura: Majoidea). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85: 857-863.
- Schlegel, C. (1911a). Anatomie sommaire de la première zoé de *Maja squinado* Latr. *Archives de Zoologie Experimental et Général* 5 (8): Notes et revues 2: 29-40.
- Schlegel, C. (1911b). Sur le développement de *Maja squinado* Latr. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 153: 480-482.
- Schuh, M. & R. Diesel (1995). Effects of salinity and starvation on the larval development of *Sesarma curacaoense* de Man, 1892, a mangrove crab with abbreviated development (Decapoda: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology* 15(4): 645-654.
- Scott, C., S. Kwasniewski, S. Falk-Petersen & J. R. Sargent (2002). Species differences, origins and functions of fatty alcohols and fatty acids in the wax esters and phospholipids of *Calanus hyperboreus*, *C. glacialis* and *C. cinereus* from Arctic waters. *Marine Ecology Progress Series* 235(127-134).
- Shakuntala, K. (1976). Copper utilization during embryogenesis of *Palaemon lamarrei*. *Experientia* 32: 627-628.
- Shakuntala, K. & S. Ravichandran (1982). Crustacean egg size as an indicator of egg fat/protein reserves. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 4 (6): 381-384.
- Shao, L., C. Wang, J. He, X. Wu & Y. Cheng (2013). Hepatopancreas and gonad quality of chinese mitten crabs fattened with natural and formulated diets. *Journal of Food Quality* 36: 217-227.
- Shieh, H. S. (1969). The biosynthesis of phospholipids in the lobster *Homarus americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 30: 679-684.
- Sibert, V., P. Ouellet & J.-C. Brêthes (2004). Changes in yolk total proteins and lipid components and embryonic growth rates during lobster (*Homarus americanus*) egg development under a simulated seasonal temperature cycle. *Marine Biology* 144: 1075-1086.
- Simons, M. J. & M. B. Jones (1981). Population and reproductive biology of the mud crab, *Macrophthalmus hirtipes* (Jacquinot, 1853) (Ocypodidae), from marine and estuarine habitats. *Journal of Natural History* 15: 981-994.
- Smith, C. C. & S. D. Fretwell (1974). The optimal balance between number and size of offspring. *The American Naturalist* 108: 499-506.
- Smith, G. G., A. J. Ritar, D. Johnston & G. A. Dunstan (2004). Influence of diet on broodstock lipid and fatty acid composition and larval competency in the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture* 233: 451-475.
- Sokolowicz, C. C., G. Bond-Buckup & L. Buckup (2006). Dynamics of gonadal development of *Aegla platensis* Schmitt (Decapoda, Anomura, Aeglididae). *Revista Brasileira de Zoologia* 23 (4): 1153-1158.
- Somers, K. (1991). Characterizing size-specific fecundity in crustaceans. *Crustacean Egg Production*. A. Wenner and A. Kuris. Rotterdam, Balkema. 7: 357-378.
- Somerton, D. A. & W. S. Meyers (1983). Fecundity differences between primiparous and multiparous female Alaskan tanner crab (*Chionoecetes bairdi*). *Journal of Crustacean Biology* 3: 183-186.
- Sotelo, G., P. Morán & D. Posada (2008). Genetic identification of the northeastern atlantic spiny spider crab as *Maja brachydactyla* Balss, 1922. *Journal of Crustacean Biology* 28(1): 76-81.
- Sotelo, G., P. Morán & D. Posada (2009). Molecular phylogeny and biogeographic history of the European Maja spider crabs (Decapoda, Majidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 314-319.
- Soundarapandian, P. & R. K. Singh (2008). Biochemical composition of the eggs of commercially important crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus). *International Journal of Zoology Research* 4: 53-58.
- Soundarapandian, P., G. K. Dinakaran, D. Varadharajan & G. K. Dinakaran (2013a). Biochemical composition during the embryonic development and freshly hatched zoea of *Macrobrachium idella idella* (Hilgendorf, 1898). *Advanced Techniques in Biology & Medicine* 1: 111.

- Soundarapandian, P., S. Sudhakar, D. Varadharajan & G. K. Dinakaran (2013b). Biochemical composition during the embryonic development and freshly hatched zoea of *Macrobrachium idae* (Heller, 1862). *Journal Earth Science & Climatic Change* 5 (1): 171.
- Soundarapandian, P., S. Ravichandran & D. Varadharajan (2013c). Biochemical composition of edible crab, *Podophthalmus vigil* (Fabricius). *Journal of Marine Science Research & Development* 3 (2): 119.
- Spaargaren Jr., D. H. & P. A. Haefner (1994). Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.) II Biochemical relationships. *Journal of Crustacean Biology* 14 (1): 6-19.
- Spaziani, E. P., G. W. Hinsch & S. C. Edwards (1993). Changes in prostaglandins E-2 and F-2alpha during vitellogenesis in the Florida crayfish *Procambarus paeninsulanus*. *Journal of Comparative Physiology* 163: 541-554.
- Spaziani, E. P. & G. W. Hinsch (1997). Variation in selected unsaturated fatty acids during vitellogenesis in the Florida freshwater crayfish *Procambarus paeninsulanus*. *Invertebrate Reproductive Development* 32: 21-25.
- Sreenivasula Reddy, P., P. Ramachandra Reddy & G. Purna Chandra Nagaraju (2004). The synthesis and effects of prostaglandins on the ovary of the crab *Oziotelphusa senex senex*. *General and Comparative Endocrinology* 135: 35-41.
- Srinivasan, P., P. Rameshthangam, N. M. Prabhu & C. Arulvasu (2012). Variation in lipid classes and fatty acid content during ovarian maturation of *Albunea symmysta*. *Journal of Advanced Scientific Research* 3 (2): 60-64.
- Staton, J. L. & S. D. Sulkin (1991). Nutritional requirements and starvation resistance in larvae of the brachyuran crabs *Sesarma cinereum* (Bosc) and *S. reticulatum* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 152: 271-284.
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Steele, D. H. & V. J. Steele (1975). Egg size and duration of embryonic development in Crustacea. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 60 (5): 711-715.
- Stevens, B. G. (2006). Embryo development and morphometry in the blue king crab *Paralithodes platypus* studied by using image and cluster analysis. *Journal of Shellfish Research* 25 (2): 569-576.
- Stevens, B. G., K. M. Swiney & L. Buck (2008). Thermal effects on embryonic development and hatching for blue king crab *Paralithodes platypus* (Brandt, 1850) held in the laboratory, and a method for predicting dates of hatching. *Journal of Shellfish Research* 27 (5): 1255-1263.
- Storch, V. & K. Anger (1983). Influence of starvation and feeding on the hepatopancreas of larval *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Helgolander Meeresun* 36 (1): 67-75.
- Subramoniam, T. (1991). Yolk utilization and esterase activity in the mole crab *Emerita asiatica* (Milne Edwards). *Crustacean Issues* 7. *Crustacean Egg Production*. A. Wenner and A. Kuris. Rotterdam, Brookfield : A. A. Balkema. 7; 7: 19-29.
- Sui, L., M. Wille, Y. Cheng & P. Sorgeloos (2007). The effect of dietary n-3 HUFA levels and DHA/EPA ratios on growth, survival and osmotic stress tolerance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* larvae. *Aquaculture* 273: 139-150.
- Sui, L. Y., X. G. Wu, M. Wille, Y. X. Cheng & P. Sorgeloos (2009). Effect of dietary soybean lecithin on reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) broodstock. *Aquaculture International* 17: 45-56.
- Sui, L. Y., H. X. Sun, X. G. Wu, M. Wille, Y. X. Cheng & P. Sorgeloos (2011). Effect of dietary HUFA on tissue fatty acid composition and reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) broodstock. *Aquaculture International* 19: 269-282.
- Sukenik, A., Y. Carmeli & T. Berner (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the esustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal Phycology* 25: 686-692.
- Suneetha, Y., P. S. Reddy, N. Jyothi & S. Reddy (2009). Proximal changes during reproduction process of the penaeid prawn, *Penaeus monodon*. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 1 (4): 333-337.

- Suprayudia, M. A., T. Takeuchia & K. Hamasakib (2004). Essential fatty acids for larval mud crab *Scylla serrata*: implications of lack of the ability to bioconvert C18 unsaturated fatty acids to highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 231: 403–416.
- Swetha, C. H., B. P. Girish & P. S. Reddy (2015). Reproductive cycle and fecundity in natural population of edible freshwater crab, *Oziothelphusa senex senex* (Fabricius, 1798) (Decapoda: Brachyura). *Journal of Aquaculture Research and Development* 6 (7): 1000349.
- Swiney, K. M. (2008). Egg extrusion, embryo development, timing and duration of eclosion, and incubation period of primiparous and multiparous tanner crabs (*Chionoecetes bairdi*). *Journal of Crustacean Biology* 28 (2): 334–341.
- Swiney, K. M., G. L. Eckert & G. H. Kruse (2013). Does maternal size affect red king crab, *Paralithodes camtschaticus*, embryo and larval quality?. *The Journal of Crustacean Biology* 33 (4): 470–480.
- Tacon, A. G. J. (1990). The essential nutrients. Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Argent Laboratories Press, Redmond.
- Tahara, D. & I. Yano (2004). Maturation-related variations in prostaglandin and fatty acid content of ovary in the kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 137: 631–637.
- Tamaru, C. S., H. Ako & R. Paguirigan (1997). Fatty acid profiles of maturation feed used in freshwater ornamental fish culture. *Hydrobiologia* 358: 265–268.
- Tamaru, C. S. & H. Ako (2000). Using commercial feeds for the culture of freshwater ornamental fishes in Hawaii. Spawning and maturation of aquatic species. UJNR Technical Report No.28. C. Tamaru, C. S. Tamaru, S. P. Mevey and K. Ikute. University of Hawaii sea grant college program, Honolulu, Hawaii: 109–120.
- Tavonatti, S. (1998). Análisis del desarrollo embrionario de la langosta de Juan Fernández *Jasus frontalis* (Crustacea: Decapoda: Palinuridae) utilizando microscopía electrónica de barrido. Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile: 143.
- Tavonatti, S. & E. Dupre (2001). Scanning electron microscopy of the embryonic development stages of the spiny lobster *Jasus frontalis* Milne-Edwards, 1836. *Invertebrate Reproduction and Development* 40 (2): 87–94.
- Teissier, G. (1933). Etude de la croissance de quelques variants sexuels chez *Macropodia rostrata* L. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique* 67: 401–444.
- Teissier, G. (1935). Croissance des variants sexuels chez L. *Travaux de l'Station Biologique de Roscoff* 13: 99–130.
- Tenore, K. R., L. F. Boyer, R. M. Cal, J. Corral, C. García, N. González, E. González-Gurriarán, R. B. Hanson, J. Iglesias, M. Krom, E. López-Jamar, J. McClain, M. M. Pamatmat, A. Pérez, D. C. Rhoads, G. de Santiago, J. Tietjen, J. Westrich & H. L. Windom (1982). Coastal upwelling in the Rías Bajas, NW Spain: Contrasting the benthic regimes of the Rías de Arousa and de Muros. *Journal of Marine Research* 40: 701–772.
- Tenore, K. R., M. Alonso-Noval, M. Álvarez-Ossorio, L. P. Atkinson, J. M. Cabanas, R. M. Cal, H. J. Campos, F. Castillejo, E. J. Chesney, N. González, R. B. Hanson, C. R. McClain, A. Miranda, M. R. Roman, J. Sánchez, G. Santiago, L. Valdés, M. Varela & J. Yoder (1995). Fisheries and oceanography off Galicia, NW Spain (FOG): mesoscale spatial and temporal changes in physical processes and resultant patterns of biological productivity. *Journal of Geophysical Research* 100: 10943–10966.
- Teshima, S., A. Kanazawa & H. Okamoto (1977). Variation in lipid classes during the molting cycle of the prawn *Penaeus japonicus*. *Marine Biology* 39: 129–136.
- Teshima, S. & A. Kanazawa (1979). Lipid transport mechanism in the prawn. *Bulletin of Japan Society of Scientific Fisheries* 45: 1341–1346.
- Teshima, S. & A. Kanazawa (1980). Transport of dietary lipids and role of serum lipoproteins in the prawn. *Bulletin of Japan Society of Scientific Fisheries* 46 (1): 51–55.
- Teshima, S. & A. Kanazawa (1983). Variation in lipid compositions during the ovarian maturation of the prawn. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 49: 957–962.
- Teshima, S., A. Kanazawa & Y. Kakuta (1986). Role of dietary phospholipids in the transport of 14C tripalmitin in the prawn. *Bulletin of Japan Society of Scientific Fisheries* 52: 519–524.

- Teshima, S., A. Kanazawa, S. Koshio & K. Horinouchi (1989). Lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: variation in lipid profiles of the ovary and hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology* 92 B: 45-49.
- Teshima, S. (1997). Phospholipids and sterols. *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture*. L. R. D'Abramo, D. E. Conklin and D. M. Akiyama. World Aquaculture Society, Baton Rouge. 6: 85-107.
- Thatje, S., G. A. Lovrich, G. Torres, W. Hagen & K. Anger (2004). Changes in biomass, lipid, fatty acid and elemental composition during the abbreviated larval development of the subantarctic shrimp *Campylonotus vagans*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 301: 159-174.
- Thessalou-Legaki, M. (1992). Reproductive variability of *Parapandalus narval* (Crustacea: Decapoda) along a depth gradient. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 35: 593-603.
- Torre Enciso, E. (1954). Contribución al conocimiento morfológico y tectónico de la Ría de La Coruña. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* 52: 21-51.
- Torres, P., G. Penha-Lopes, L. Narciso, A. Macia & J. Paula (2008). Fatty acids dynamics during embryonic development in genus *Uca* (Brachyura: Ocypodidae), from the mangroves of Inhaca Island, Mozambique. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 80: 307-313.
- Tripathi, G. & P. Verma (2003). Starvation induced impairment of metabolism in a fresh water catfish. *Zeitschrift für Naturforschung* 58 C: 446-451.
- Tseng, D. Y., Y. N. Chen, G. H. Koua, Ch. F. Loa & Ch. M. Kuo (2001). Hepatopancreas is the extraovarian site of vitellogenin synthesis in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 1129: 909-917.
- Tuck, I. D., A. C. Taylor, R. J. A. Atkinson, M. E. Gramitto & C. Smith (1997). Biochemical composition of *Nephrops norvegicus*: changes associated with ovary maturation. *Marine Biology* 129: 505-511.
- Tuck, I. D., A. Atkinson & C. J. Chapman (2000). Population biology of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.) in the Firth of Clyde, Scotland II: fecundity and size at onset of sexual maturity. *ICES Journal of marine Science* 57: 1227-1239.
- Turner, R. L. & J. M. Lawrence (1979). Volume and composition of echinoderm eggs: implications for the use of egg size in life-history models. *Reproductive Ecology of Marine Invertebrates*. S. E. Stancyk. Columbia, SC, University of South Carolina Press: 25-40.
- Tziouveli, V. & G. G. Smith (2012). A comparison of the fatty acid profiles of adult tissues, and newly hatched, fed and starved *Lysmata amboinensis* larvae. *Aquaculture Research* 43: 577-575.
- Udekem d'Acoz, C. (1999). Inventaire et distribution des crustacés décapodes de l'Atlantique nord-oriental, de la Méditerranée et des eaux continentales adjacentes au nord de 25°N. *Patrimoines naturels* 40: 383.
- Underwood, A. J. & M. J. Keough (2001). Supply-side ecology: the nature and consequences of variations in recruitment of intertidal organisms. *Marine community ecology*. M. D. Bertness, S. D. Gaines and M. E. Hay. Sinauer Associates, Sunderland, MA: 183-200.
- Unnikrishnan, U., K. Chakraborty & R. Paulraj (2010). Efficacy of various lipid supplements in formulated pellet diets for juvenile *Scylla serrata*. *Aquaculture Research* 41 (10): 1498-1513.
- Urcera, M. J., R. Arnaiz, N. Rua & A. Coa (1993). Cultivo de la centolla *Maja squinado*: Influencia de la dieta en el desarrollo larvario. *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*, Isla de Arosa, Spain.
- Urzúa, Á. & K. Anger (2012). Seasonal variations in larval biomass and biochemical composition of brown shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea), at hatching. *Helgolander Marine Research* 67(2): 267-277.
- Urzúa, A., U. Paschke, P. Gebauer & K. Anger (2012). Seasonal and interannual variations in size, biomass and chemical composition of the eggs of North Sea shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda: Caridea). *Marine Biology* 159: 583-599.
- Valdés, L., M. T. Alvarez-Osorio & E. González-Gurriarán (1991). Incubation of eggs of *Necora puber* (L., 1767) (Decapoda, Brachyura, Portunidae). Volumen and biomass changes in embryonic development. *Crustaceana* 60 (2): 163-177.
- Varela, M., R. Prego, M. Canle & J. Lorenzo (1994). The Ría de La Coruña, is hydrologically a ría?. *Gaia* 9: 3-5.

- Varisco, M. & J. Vinuesa (2011). Reproductive biology of the spider crab *Leucippa pentagona* (Decapoda: Epialtidae), in Bustamante Bay, Argentina. *Latin American Journal of Aquatic Research* 39 (3): 471-480.
- Vazzoler, A. E. A. M. (1996). *Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática*. Maringá: Eduem: 169.
- Veera Ravi, A. (1994). Biochemical changes during embryonic and larval development of the edible Portunid crab *Charybdis lucifera* (Fabricius), Annamalai University, India: 97.
- Verísimo, P., C. Bernárdez, E. González-Gurriarán, J. Freire, R. Muiño & L. Fernández (2011). Changes between consecutive broods in the fecundity of the spider crab, *Maja brachydactyla*. *ICES Journal of Marine Science* 68 (3): 472-478.
- Vijayakumar, G. (1992). Yolk utilization, impact of salinity, phosphomidan and cadmium on the larval development of the mangrove crab, *Sesarma brockii* De Man, Annamalai University, India: 124.
- Vijayakumaran, M. & E. V. Radhakrishnan (2002). Changes in biochemical and mineral composition during ovarian maturation in the spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus). *Journal of the Marine Biological Association of India* 44 (1-2): 85-96.
- Villalejo-Fuerte, M., M. Arellano-Martínez & B. P. Ceballos-Vazquez (1999). Fecundity of the velvet spidercrab *Stenocionops ovata* (Bell, 1835) (Brachyura: Majidae) in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Shellfish Research* 18 (1): 181-183.
- Vinagre, A. S., A. P. N. do Amaral, F. P. Ribarcki, E. F. da Silveira & E. Périco (2007). Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146: 514-519.
- Virtue, P., P. D. Nichols, S. Nicol, A. McMinin & E. Sikes (1993). The lipid composition of *Euphausia superba* Dana in relation to the nutritional value of *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim. *Antarctic Science* 5: 169-177.
- Volkman, J. K., S. M. Barrett, S. I. Blackburn, M. P. Mansour, E. L. Sikes & F. Gelin (1998). Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Organic Geochemistry* 29 (5-7): 1163-1179.
- Wang, L. Q., H. Y. Li, W. Hu & H. Jiang (2004). Effect of dietary phospholipids on growth and feed conversion rate of young mitten crab of *Eriocheir sinensis*. *Feed Research* 1: 8-10.
- Ward, D. G., B. S. Middleditch, S. R. Missler & A. L. Lawrence (1979). Fatty acid change during larval development of *Penaeus setiferus*. *Proceedings of the World Mariculture Society* 10: 464-471.
- Wear, R. G. (1974). Incubation in british decapod crustacea, and the effects of temperature on the rate and success of embryonic development. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 54: 745-762.
- Webb, J. B., L. M. Stichert, G. L. Eckert & G. H. Kruse (2012). Developing biological reference points for crustacean fisheries: the contribution of fecundity and embryo quality to reproductive potential of eastern Bering Sea snow crab. *Developing biological reference points for crustacean fisheries: Reproductive potential of Bristol Bay red king crab and eastern Bering Sea snow crab*. K. M. Swiney, J. B. Webb, G. L. Eckert and G. H. Kruse: 125.
- Wehrtmann, I. S. & M. Graeve (1998). Lipid composition and utilization in developing eggs of two tropical marine caridean shrimps (Decapoda: Caridea: Alpheidae, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 121: 457-463.
- Wehrtmann, I. S. & G. Kattner (1998). Changes in volume, biomass, and fatty acids of developing eggs in *Nauticaris magellanica* (Decapoda: Caridea): A latitudinal comparison. *Journal of Crustacean Biology* 18 (3): 413-422.
- Wen, X. B., L. Q. Chen, Ch X. Ai, Z. Zhou & H. Jiang (2001). Variation in lipid composition of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* during ovarian maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 130: 95-104.
- Wen, X. B., L. Q. Chen, Z. L. Zhou, C. X. Ai & G. Y. Deng (2002). Reproduction response of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) fed different sources of dietary lipid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 131(3): 675-681.

- Wen, X. B., L. Q. Chen, Z. L. Zhou, C. X. Ai & G. Y. Deng (2010). Reproduction response of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) fed different sources of dietary lipid. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131A: 675-681.
- Wheaton, F. & T. Lawson (1985). *Processing Aquatic Food Products*. New York: 518.
- Whyte, J. N. C., N. G. Ginther & J. O. T. Jensen (1993). Biochemical changes during embryogenesis of the Pacific halibut, *Hippoglossus stenolepis* (Schmidt). *Aquaculture Research* 24: 193-201.
- Wickins, J. F., T. W. Beard & A. R. Child (1995). Maximizing lobster, *Homarus gammarus* (L.), egg and larval viability. *Aquaculture Research* 26: 379-392.
- Wimuttisuk, W., P. Tobwor, P. Deenarn, K. Danwisetkanjana, D. Pinkaew, K. Kirtikara & V. Vichai (2013). Insights into the prostanoïd pathway in the ovary development of the penaeid shrimp *Penaeus monodon*. *PLoS ONE* 8 (10): e76934.
- Winberg, G. (1971). *Methods for estimation of production of aquatic animals*. New York, Academic Press: 175.
- Wooster, W. S., A. Bakun & D.R. McClain (1976). The seasonal upwelling cycle along the eastern boundary of the North Atlantic. *Journal of Marine Research* 34: 131-141.
- Wouters, R., L. Gomez, P. Lavens & J. Calderon (1999). Feeding enriched Artemia biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: Its effect on reproductive performance and larval quality. *Journal of Shellfish Research* 18: 651-656.
- Wouters, R., C. Molina, P. Lavens & J. Calderón (2001a). Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation. *Aquaculture* 198: 307-323.
- Wouters, R., X. Piguave, L. Bastidas, J. Calderón & P. Sorgeloos (2001b). Ovarian maturation and haemolymphatic vitellogenin concentration of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed increasing levels of total dietary lipids and HUFA. *Aquaculture Research* 32: 573-582.
- Wouters, R., P. Lavens, J. Nieto & P. Sorgeloos (2001c). Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture* 202: 1-21.
- Wu, X., Y. Cheng, L. Sui, X. Yang, T. Nan & J. Wang (2007a). Biochemical composition of pond-reared and lake-stocked Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) broodstock. *Aquaculture Research* 38: 1459-1467.
- Wu, X., Y. Cheng, L. Sui, C. Zeng, P. C. Southgate & X. Yang (2007b). Effect of dietary supplementation of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), female broodstock. *Aquaculture* 273: 602-613.
- Wu, X., Y. Cheng, C. Zeng, C. Wang & X. Yang (2010a). Reproductive performance and offspring quality of wild-caught and pond-reared swimming crab *Portunus trituberculatus* broodstock. *Aquaculture* 301: 78-84.
- Wu, X., G. Chang, Y. Cheng, C. Zeng, P. C. Southgate & J. Lu (2010b). Effects of dietary phospholipid and highly unsaturated fatty acid on the gonadal development, tissue proximate composition, lipid class and fatty acid composition of precocious Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture Nutrition* 16: 25-36.
- Wu, X., Y. Cheng, C. Zeng, C. Wang & Z. Cui (2010c). Reproductive performance and offspring quality of the first and the second brood of female swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture* 303: 94-100.
- Wu, X., Z. Wang, Y. X. Cheng, C. Zeng, X. Yang & J. Lu (2011). Effects of dietary phospholipids and highly unsaturated fatty acids on the precocity, survival, growth and hepatic lipid composition of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards). *Aquaculture Research* 42: 457-468.
- Xu, X. L., W. J. Ji, J. D. Castell & R. K. O'Dor (1994a). Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture* 119: 359-370.
- Xu, X. L., W. J. Ji, J. D. Castell & R. K. O'Dor (1994b). Essential fatty acid requirement of the Chinese prawn, *Penaeus chinensis*. *Aquaculture* 127: 29-40.

- Xu, X.-H., B.-L. Yan, J.-T. Xu & G. C. Xu (2014). Biochemical composition dynamics of the ovaries and hepatopancreas at different physiological stages of the female marine crab, *Charybdis japonica*. *Journal of Crustacean Biology* 34 (1): 61-69.
- Yamada, R., K. Kodama, K. Kodama, T. Yamakawa, T. Horiguchi & I. Aoki (2006). Growth and reproductive biology of the small penaeid shrimp *Trachysalambria curvirostris* in Tokyo Bay. *Marine Biology* 151: 961-971.
- Yao, J., Y. Zhao, Q. Wang, Z. Zhong & X. Hu (2006). Biochemical compositions and digestive enzyme activities during the embryonic development of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 253: 573-582.
- Ying, X.-P., W.-X. Yang & Y. -P. Zhang (2006). Comparative studies on fatty acid composition of the ovaries and hepatopancreas at different physiological stages of the Chinese mitten crab. *Aquaculture* 256: 617-623.
- Yosho, I. (2000). Reproductive cycle and fecundity of *Chionoecetes japonicus* (Brachyura: Majidae) off the coast of Central Honshu, Sea of Japan. *Fisheries Science* 66: 940-946.
- Zerbib, C. (1979). Etude ultrastructurale de l'ovocyte en vitellogenèse chez les *Ecrevisses* *Astacus astacus* et *Astacus leptodactylus*. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 1: 289-295.
- Zhou, Q. C., C. C. Li, C. W. Liu, S. Y. Chi & Q. H. Yang (2007). Effects of dietary lipid sources on growth and fatty acid composition of juvenile shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 13 (3): 222-229.
- Zhou, B., X.-G. Wu, L. Feng, Y. -X. Cheng, X. -Z. Yang & Z. -J. Liu (2011). A comparative study of lipid class and fatty acid composition of mature ovary and early embryo of *Portunus pelagicus*. *Journal of Shanghai Ocean University* 20 (6).
- Zuur, A. F., E. N. Ieno & C. S. Elphick (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution* 1 (1): 1-3.

9 ANEXO

1. Efecto de la talla de la hembra en las variables biométricas y bioquímicas

Tabla 1.1. Efecto de la talla de la hembra en las variables biométricas y bioquímicas de los huevos de medio natural (Capítulo 4).

| Parámetros | Ría de Arousa | | | Ría de A Coruña | | |
|--|---------------|--------|--|-----------------|---------|--|
| | r^2 | p | Por huevo ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de PS) | r^2 | p | Por huevo ($\mu\text{g}/\text{huevo}$) |
| Diámetro medio (μm) | 0.01 | 0.47 | -- | 0.004 | 0.64 | -- |
| Volumen (mm^3) | 0.02 | 0.30 | -- | 0.01 | 0.56 | -- |
| Peso seco huevo | 0.004 | 0.63 | -- | 0.02 | 0.25 | -- |
| Agua ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) | 0.02 | 0.27 | 0.02 | 0.01 | 0.45 | 0.50 |
| MO ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) | 0.01 | 0.46 | 0.001 | 0.01 | 0.37 | 0.20 |
| Cenizas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PH) | 0.007 | 0.54 | 0.001 | 0.002 | 0.71 | 0.75 |
| C ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.002 | 0.73 | 0.008 | 0.0001 | 0.93 | 0.21 |
| Relación C/N | 0.008 | 0.51 | -- | 0.00 | 0.96 | -- |
| Lip ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.001 | 0.84 | 0.006 | 0.004 | 0.64 | 0.06 |
| Prot ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.02 | 0.29 | 0.003 | 0.01 | 0.53 | 0.27 |
| Relación Lip/Prot | 0.004 | 0.67 | -- | 0.01 | 0.54 | -- |
| Carbo ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.01 | 0.46 | 0.02 | 0.13 | p<0.001 | p<0.05 |
| Energía ^s ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.002 | 0.73 | 0.01 | 0.0001 | 0.93 | 0.23 |
| Energía ^w ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.00 | 0.98 | 0.005 | 0.003 | 0.65 | 0.25 |
| NL ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.0004 | 0.91 | 0.03 | 0.003 | 0.75 | 0.94 |
| GL ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.11 | p<0.01 | 0.11 | 0.06 | 0.13 | 0.14 |
| PL ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.07 | 0.14 | 0.03 | 0.06 | 0.11 | 0.08 |
| ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.08 | 0.12 | 0.05 | 0.03 | 0.24 | 0.30 |
| ARN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.13 | p<0.05 | 0.09 | 0.03 | 0.30 | 0.37 |
| Relación ARN/ADN | 0.06 | 0.18 | -- | 0.002 | 0.77 | -- |
| SFA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.06 | 0.18 | 0.05 | 0.01 | 0.45 | 0.44 |
| MUFA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.05 | 0.23 | 0.005 | 0.01 | 0.56 | 0.71 |
| PUFA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.05 | 0.22 | 0.03 | 0.02 | 0.35 | 0.31 |
| TOTAL ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS) | 0.04 | 0.30 | 0.001 | 0.02 | 0.43 | 0.55 |

Tabla 1.2. Efecto de la talla de la hembra en las variables biométricas y bioquímicas de los huevos a lo largo del desarrollo embrionario (Capítulo 5).

| Estados de desarrollo embrionario | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------|------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|------|----------------|------|----------------|--------|
| Parámetros | Estado I | | Estado II | | Estado III | | Estado IV | | Estado V | | Estado VI | |
| | r ² | p | r ² | p | r ² | p | r ² | p | r ² | p | r ² | p |
| Diámetro medio (µm) | 0.001 | 0.75 | 0.082 | 0.12 | 0.004 | 0.62 | 0.02 | 0.37 | 0.03 | 0.25 | 0.01 | 0.58 |
| Volumen (mm³) | 0.02 | 0.26 | 0.28 | p<0.01 | 0.07 | 0.04 | 0.05 | 0.21 | 0.001 | 0.85 | 0.02 | 0.50 |
| Índice ocular (µm) | | | | | | | 0.003 | 0.76 | 0.006 | 0.64 | 0.01 | 0.52 |
| Agua (µg/mg PH) | 0.001 | 0.74 | 0.000 | 0.99 | 0.05 | 0.08 | 0.01 | 0.64 | 0.01 | 0.62 | 0.02 | 0.48 |
| MO (µg/mg PH) | 0.003 | 0.62 | 0.008 | 0.64 | 0.01 | 0.39 | 0.02 | 0.37 | 0.002 | 0.79 | 0.02 | 0.48 |
| Cenizas (µg/mg PH) | 0.007 | 0.44 | 0.036 | 0.31 | 0.01 | 0.58 | 0.04 | 0.26 | 0.02 | 0.36 | 0.003 | 0.76 |
| C (µg/mg PS) | 0.001 | 0.75 | 0.087 | 0.11 | 0.12 | p<0.01 | 0.11 | 0.05 | 0.04 | 0.22 | 0.02 | 0.45 |
| Relación C/N | 0.0001 | 0.93 | 0.0793 | 0.12 | 0.10 | p<0.05 | 0.11 | 0.05 | 0.03 | 0.27 | 0.003 | 0.78 |
| Lip (µg/huevo) | 0.02 | 0.20 | 0.01 | 0.63 | 0.02 | 0.29 | 0.00 | 0.99 | 0.04 | 0.19 | 0.10 | 0.08 |
| Prot (µg/huevo) | 0.005 | 0.53 | 0.011 | 0.58 | 0.001 | 0.80 | 0.002 | 0.78 | 0.001 | 0.85 | 0.06 | 0.19 |
| Carbo (µg/mg PS) | 0.001 | 0.75 | 0.064 | 0.17 | 0.002 | 0.76 | 0.02 | 0.39 | 0.07 | 0.10 | 0.02 | 0.48 |
| Energía ^s (µg/mg PS) | 0.001 | 0.75 | 0.087 | 0.11 | 0.12 | p<0.01 | 0.11 | 0.05 | 0.04 | 0.22 | 0.02 | 0.45 |
| Energía ^w (µg/mg PS) | 0.008 | 0.42 | 0.002 | 0.83 | 0.02 | 0.33 | 0.005 | 0.69 | 0.04 | 0.24 | 0.13 | p<0.05 |
| ADN (µg/mg PS) | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 0.81 | 0.001 | 0.84 | 0.0002 | 0.94 | 0.0002 | 0.93 | 0.003 | 0.78 |
| ARN (µg/mg PS) | 0.001 | 0.81 | 0.006 | 0.68 | 0.002 | 0.76 | 0.01 | 0.50 | 0.001 | 0.83 | 0.02 | 0.42 |
| Relación ARN/ADN | 0.008 | 0.41 | 0.035 | 0.32 | 0.005 | 0.60 | 0.03 | 0.36 | 0.000 | 0.92 | 0.04 | 0.27 |
| SFA (µg/mg PS) | 0.01 | 0.58 | 0.08 | 0.21 | 0.02 | 0.35 | 0.18 | 0.04 | 0.01 | 0.69 | 0.01 | 0.68 |
| MUFA (µg/mg PS) | 0.01 | 0.40 | 0.06 | 0.25 | 0.01 | 0.55 | 0.001 | 0.85 | 0.06 | 0.18 | 0.04 | 0.34 |
| PUFA (µg/mg PS) | 0.05 | 0.06 | 0.09 | 0.17 | 0.001 | 0.86 | 0.07 | 0.23 | 0.01 | 0.68 | 0.01 | 0.70 |
| TOTAL (µg/mg PS) | 0.04 | 0.09 | 0.13 | 0.09 | 0.001 | 0.88 | 0.09 | 0.16 | 0.01 | 0.52 | 0.01 | 0.63 |

| Ría de Arousa | | | | | | | | | | Ría de A Coruña | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|--|----------------|------|--|----------------|--------|--|----------------|-----------------|--|----------------|------|--|----------------|--------|--|----------------|---------|--------|
| Estado II | | | Estado III | | | Estado IV | | | Estado I | | | Estado II | | | Estado III | | | Estado IV | | |
| r ² | p | | r ² | p | | r ² | p | | r ² | p | | r ² | p | | r ² | p | | r ² | p | |
| Parámetros | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.002 | 0.80 | | 0.07 | 0.09 | | 0.16 | p<0.01 | | 0.03 | 0.34 | | 0.06 | 0.06 | | 0.13 | p<0.01 | | 0.04 | 0.14 | |
| 0.002 | 0.80 | | 0.05 | 0.15 | | 0.16 | p<0.01 | | 0.04 | 0.30 | | 0.04 | 0.10 | | 0.06 | 0.06 | | 0.04 | 0.16 | |
| 0.03 | 0.25 | | 0.03 | 0.30 | | 0.02 | 0.29 | | 0.001 | 0.90 | | 0.003 | 0.70 | | 0.002 | 0.72 | | 0.003 | 0.14 | p<0.01 |
| 0.03 | 0.27 | | 0.04 | 0.21 | | 0.01 | 0.46 | | 0.02 | 0.47 | | 0.003 | 0.69 | | 0.007 | 0.52 | | 0.003 | 0.17 | p<0.01 |
| 0.03 | 0.30 | | 0.03 | 0.30 | | 0.01 | 0.49 | | 0.02 | 0.52 | | 0.002 | 0.71 | | 0.01 | 0.42 | | 0.003 | 0.03 | 0.27 |
| 0.05 | 0.17 | | 0.00 | 0.99 | | 0.01 | 0.59 | | 0.03 | 0.27 | | 0.001 | 0.78 | | 0.02 | 0.30 | | 0.0001 | 0.94 | |
| 0.03 | 0.28 | | 0.0002 | 0.92 | | 0.007 | 0.57 | | 0.004 | 0.73 | | 0.00 | 0.98 | | 0.003 | 0.66 | | 0.00 | 0.97 | |
| 0.00 | 0.97 | | 0.002 | 0.78 | | 0.0004 | 0.89 | | 0.001 | 0.86 | | 0.004 | 0.63 | | 0.04 | 0.13 | | 0.0001 | 0.95 | |
| 0.02 | 0.31 | | 0.03 | 0.28 | | 0.005 | 0.64 | | 0.08 | 0.13 | | 0.02 | 0.27 | | 0.02 | 0.30 | | 0.002 | 0.75 | |
| 0.0001 | 0.95 | | 0.01 | 0.50 | | 0.0004 | 0.90 | | 0.09 | 0.11 | | 0.01 | 0.39 | | 0.003 | 0.66 | | 0.008 | 0.52 | |
| 0.02 | 0.33 | | 0.0001 | 0.95 | | 0.004 | 0.68 | | 0.03 | 0.37 | | 0.001 | 0.84 | | 0.05 | 0.09 | | 0.003 | 0.71 | |
| 0.10 | p<0.05 | | 0.003 | 0.74 | | 0.07 | 0.06 | | 0.02 | 0.46 | | 0.02 | 0.33 | | 0.02 | 0.30 | | 0.01 | 0.40 | |
| 0.01 | 0.46 | | 0.002 | 0.75 | | 0.0001 | 0.94 | | 0.03 | 0.36 | | 0.0003 | 0.90 | | 0.04 | 0.11 | | 0.00 | 0.99 | |
| 0.0003 | 0.91 | | 0.02 | 0.36 | | 0.02 | 0.39 | | 0.04 | 0.28 | | 0.005 | 0.60 | | 0.00 | 0.99 | | 0.02 | 0.38 | |
| 0.03 | 0.31 | | 0.03 | 0.28 | | 0.005 | 0.65 | | 0.08 | 0.13 | | 0.02 | 0.26 | | 0.02 | 0.30 | | 0.002 | 0.75 | |
| 0.05 | 0.15 | | 0.004 | 0.67 | | 0.03 | 0.27 | | 0.02 | 0.41 | | 0.004 | 0.65 | | 0.06 | 0.07 | | 0.02 | 0.34 | |
| 0.01 | 0.55 | | 0.04 | 0.22 | | 0.01 | 0.46 | | 0.05 | 0.23 | | 0.002 | 0.75 | | 0.02 | 0.31 | | 0.06 | 0.08 | |
| 0.00 | 0.99 | | 0.02 | 0.38 | | 0.01 | 0.58 | | 0.02 | 0.46 | | 0.001 | 0.86 | | 0.06 | 0.07 | | 0.18 | p<0.01 | |
| 0.03 | 0.26 | | 0.003 | 0.74 | | 0.01 | 0.52 | | 0.02 | 0.45 | | 0.001 | 0.84 | | 0.01 | 0.42 | | 0.09 | p<0.05 | |
| 0.06 | 0.12 | | 0.01 | 0.47 | | 0.04 | 0.19 | | 0.06 | 0.20 | | 0.0002 | 0.92 | | 0.03 | 0.16 | | 0.001 | 0.87 | |
| 0.06 | 0.13 | | 0.04 | 0.21 | | 0.01 | 0.57 | | 0.01 | 0.60 | | 0.00 | 0.99 | | 0.01 | 0.58 | | 0.01 | 0.55 | |
| 0.02 | 0.36 | | 0.04 | 0.22 | | 0.15 | p<0.01 | | 0.05 | 0.25 | | 0.001 | 0.82 | | 0.06 | 0.05 | | 0.03 | 0.23 | |
| 0.03 | 0.29 | | 0.09 | 0.05 | | 0.01 | 0.48 | | 0.08 | 0.12 | | 0.005 | 0.61 | | 0.02 | 0.27 | | 0.26 | p<0.001 | |
| 0.003 | 0.75 | | 0.0001 | 0.96 | | 0.01 | 0.49 | | 0.01 | 0.60 | | 0.001 | 0.82 | | 0.02 | 0.27 | | 0.05 | 0.11 | |
| 0.02 | 0.36 | | 0.0004 | 0.90 | | 0.0003 | 0.90 | | 0.03 | 0.37 | | 0.0001 | 0.94 | | 0.02 | 0.34 | | 0.02 | 0.35 | |
| 0.02 | 0.35 | | 0.004 | 0.68 | | 0.007 | 0.57 | | 0.03 | 0.34 | | 0.0002 | 0.91 | | 0.02 | 0.25 | | 0.09 | 0.04 | |

2. Perfiles de ácidos grasos

Tabla 2.1. Variaciones en la proporción (% del total de ácido grasos) de los ácidos grasos individuales y de los sumatorios por grupos de ácidos grasos saturados (SFA), ramificados (BFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) a lo largo del desarrollo embrionario de puestas consecutivas de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar.

| 1ª Puesta | | | | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado V | Estado VI |
| 12:0 (%) | 0.46 \pm 0.03 | 0.46 \pm 0.03 | 0.47 \pm 0.02 | 0.52 \pm 0.04 | 0.55 \pm 0.03 | 0.57 \pm 0.03 |
| 13:0 (%) | 0.02 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.01 | 0.02 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.01 |
| 14:0 (%) | 2.97 \pm 0.18 | 2.98 \pm 0.16 | 2.71 \pm 0.25 | 2.66 \pm 0.11 | 2.32 \pm 0.19 | 1.94 \pm 0.10 |
| 15:0 (%) | 1.06 \pm 0.05 | 1.11 \pm 0.05 | 1.13 \pm 0.04 | 1.23 \pm 0.04 | 1.36 \pm 0.04 | 1.43 \pm 0.04 |
| 16:0 (%) | 17.58 \pm 0.74 | 17.89 \pm 0.92 | 17.46 \pm 0.53 | 16.46 \pm 0.5 | 15.26 \pm 0.48 | 13.12 \pm 0.68 |
| 18:0 (%) | 5.55 \pm 0.14 | 5.46 \pm 0.21 | 5.21 \pm 0.05 | 5.53 \pm 0.04 | 5.65 \pm 0.05 | 5.90 \pm 0.10 |
| 20:0 (%) | 0.12 \pm 0.07 | 0.08 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.02 | 0.14 \pm 0.02 | 0.16 \pm 0.03 | 0.17 \pm 0.03 |
| 21:0 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 22:0 (%) | 0.06 \pm 0.02 | 0.07 \pm 0.02 | 0.06 \pm 0.02 | 0.08 \pm 0.02 | 0.08 \pm 0.03 | 0.09 \pm 0.04 |
| 23:0 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| ΣSFA (%) | 27.83 \pm 0.75 | 28.06 \pm 0.92 | 27.17 \pm 0.50 | 26.66 \pm 0.43 | 25.42 \pm 0.66 | 23.25 \pm 0.75 |
| Iso 15:0 (%) | 0.20 \pm 0.01 | 0.21 \pm 0.01 | 0.22 \pm 0.01 | 0.24 \pm 0.01 | 0.26 \pm 0.01 | 0.24 \pm 0.01 |
| Anteiso 15:0 (%) | 0.34 \pm 0.01 | 0.35 \pm 0.02 | 0.36 \pm 0.01 | 0.41 \pm 0.01 | 1.25 \pm 0.03 | 1.17 \pm 0.02 |
| Iso 16:0 (%) | 0.24 \pm 0.01 | 0.24 \pm 0.01 | 0.25 \pm 0.01 | 0.29 \pm 0.01 | 0.50 \pm 0.01 | 0.40 \pm 0.01 |
| Anteiso 16:0 (%) | 0.08 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.01 | 0.10 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.01 | 0.29 \pm 0.01 |
| ΣBFA (%) | 0.87 \pm 0.01 | 0.89 \pm 0.01 | 0.92 \pm 0.01 | 1.04 \pm 0.02 | 2.29 \pm 0.05 | 2.11 \pm 0.04 |
| 14:1w5 (%) | 0.02 \pm 0.03 | 0.01 \pm 0.03 | 0.01 \pm 0.02 | 0.01 \pm 0.01 | 0.01 \pm 0.01 | 0.01 \pm 0.01 |
| 16:1w7 (%) | 8.30 \pm 0.21 | 7.76 \pm 0.13 | 8.11 \pm 0.18 | 8.12 \pm 0.05 | 8.23 \pm 0.07 | 7.18 \pm 0.18 |
| 16:1w5 (%) | 0.05 \pm 0.01 | 0.05 \pm 0.01 | 0.05 \pm 0.01 | 0.06 \pm 0.01 | 0.00 \pm 0.00 | 0.20 \pm 0.01 |
| 17:1w8 (%) | 0.48 \pm 0.02 | 0.48 \pm 0.02 | 0.48 \pm 0.02 | 0.50 \pm 0.01 | 0.53 \pm 0.02 | 0.41 \pm 0.06 |
| 18:1w13 (%) | 0.57 \pm 0.01 | 0.58 \pm 0.01 | 0.61 \pm 0.01 | 0.69 \pm 0.02 | 1.05 \pm 0.02 | 0.88 \pm 0.02 |
| 18:1w9 (%) | 11.55 \pm 0.30 | 11.45 \pm 0.23 | 11.4 \pm 0.08 | 10.48 \pm 0.09 | 8.28 \pm 0.14 | 8.65 \pm 0.11 |
| 18:1w7 (%) | 5.82 \pm 0.31 | 5.76 \pm 0.15 | 5.89 \pm 0.07 | 6.10 \pm 0.09 | 6.47 \pm 0.07 | 6.04 \pm 0.09 |
| 20:1w15 (%) | 0.09 \pm 0.02 | 0.09 \pm 0.02 | 0.09 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.02 | 0.09 \pm 0.01 | 0.33 \pm 0.01 |
| 20:1w14 (%) | 0.28 \pm 0.02 | 0.29 \pm 0.02 | 0.30 \pm 0.02 | 0.34 \pm 0.01 | 0.83 \pm 0.02 | 0.66 \pm 0.01 |
| 20:1w9 (%) | 0.67 \pm 0.07 | 0.62 \pm 0.05 | 0.60 \pm 0.07 | 0.77 \pm 0.10 | 1.05 \pm 0.12 | 1.27 \pm 0.09 |
| 22:1w9 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 23:1w9 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 24:1w9 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| ΣMUFA (%) | 27.82 \pm 0.41 | 27.09 \pm 0.47 | 27.53 \pm 0.22 | 27.15 \pm 0.25 | 26.8 \pm 0.36 | 25.68 \pm 0.14 |
| 18:2w6 (%) | 1.82 \pm 0.06 | 1.86 \pm 0.03 | 1.76 \pm 0.05 | 1.59 \pm 0.08 | 1.21 \pm 0.04 | 1.05 \pm 0.10 |
| 18:3w6 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 18:3w3 (%) | 0.89 \pm 0.04 | 0.88 \pm 0.04 | 0.86 \pm 0.04 | 0.79 \pm 0.05 | 0.70 \pm 0.06 | 0.67 \pm 0.03 |
| 20:3w6 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 20:4w6 (%) | 2.07 \pm 0.08 | 2.04 \pm 0.04 | 2.00 \pm 0.09 | 2.08 \pm 0.09 | 2.22 \pm 0.05 | 2.24 \pm 0.05 |
| 20:2w9,15 (%) | 0.08 \pm 0.02 | 0.08 \pm 0.01 | 0.08 \pm 0.02 | 0.09 \pm 0.03 | 0.25 \pm 0.01 | 0.33 \pm 0.01 |
| 20:2w6,15 (%) | 0.04 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.02 | 0.05 \pm 0.02 | 0.17 \pm 0.03 | 0.10 \pm 0.01 |
| 20:2w6 (%) | 0.29 \pm 0.04 | 0.30 \pm 0.01 | 0.27 \pm 0.03 | 0.31 \pm 0.03 | 0.30 \pm 0.05 | 0.42 \pm 0.05 |
| 20:3w3 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 20:4w3 (%) | 0.11 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.01 | 0.12 \pm 0.03 | 0.13 \pm 0.01 | 0.15 \pm 0.01 | 0.27 \pm 0.01 |
| 20:5w3 (%) | 21.53 \pm 0.42 | 21.72 \pm 0.21 | 21.81 \pm 0.19 | 22.29 \pm 0.3 | 23.32 \pm 0.22 | 24.36 \pm 0.27 |
| 22:2w6 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 22:5w3 (%) | 0.64 \pm 0.01 | 0.65 \pm 0.01 | 0.68 \pm 0.01 | 0.77 \pm 0.02 | 0.92 \pm 0.02 | 0.72 \pm 0.01 |
| 22:6w3 (%) | 16.02 \pm 0.20 | 16.29 \pm 0.23 | 16.76 \pm 0.12 | 17.04 \pm 0.29 | 16.26 \pm 0.12 | 18.80 \pm 0.57 |
| ΣPUFA (%) | 43.48 \pm 0.51 | 43.96 \pm 0.47 | 44.38 \pm 0.36 | 45.15 \pm 0.26 | 45.49 \pm 0.27 | 48.96 \pm 0.74 |

Tabla 2.1. Variaciones en la proporción (% del total de ácido grasos) de los ácidos grasos individuales y de los sumatorios por grupos de ácidos grasos saturados (SFA), ramificados (BFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) a lo largo del desarrollo embrionario de puestas consecutivas de *M. brachydactyla*. En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar (continuación).

| 2ª Puesta | | | | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Parámetros | Estado I | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado V | Estado VI |
| 12:0 (%) | 0.48 \pm 0.05 | 0.48 \pm 0.02 | 0.45 \pm 0.02 | 0.5 \pm 0.03 | 0.55 \pm 0.03 | 0.56 \pm 0.01 |
| 13:0 (%) | 0.03 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.02 | 0.03 \pm 0.02 | 0.03 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.01 |
| 14:0 (%) | 3.19 \pm 0.29 | 3.10 \pm 0.29 | 2.76 \pm 0.41 | 2.71 \pm 0.12 | 2.46 \pm 0.31 | 2.02 \pm 0.19 |
| 15:0 (%) | 1.01 \pm 0.07 | 1.13 \pm 0.06 | 1.15 \pm 0.08 | 1.24 \pm 0.08 | 1.36 \pm 0.05 | 1.42 \pm 0.05 |
| 16:0 (%) | 17.80 \pm 1.29 | 17.91 \pm 1.18 | 17.74 \pm 0.52 | 16.99 \pm 0.97 | 15.52 \pm 0.83 | 13.10 \pm 0.73 |
| 18:0 (%) | 5.49 \pm 0.16 | 5.44 \pm 0.22 | 5.20 \pm 0.09 | 5.57 \pm 0.14 | 5.65 \pm 0.05 | 5.91 \pm 0.07 |
| 20:0 (%) | 0.10 \pm 0.03 | 0.09 \pm 0.02 | 0.08 \pm 0.03 | 0.09 \pm 0.03 | 0.11 \pm 0.04 | 0.15 \pm 0.03 |
| 21:0 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 22:0 (%) | 0.06 \pm 0.02 | 0.06 \pm 0.02 | 0.06 \pm 0.02 | 0.06 \pm 0.04 | 0.05 \pm 0.02 | 0.12 \pm 0.02 |
| 23:0 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| ΣSFA (%) | 28.25 \pm 1.28 | 28.26 \pm 1.02 | 27.48 \pm 0.67 | 27.2 \pm 0.83 | 25.73 \pm 0.87 | 23.29 \pm 0.82 |
| Iso 15:0 (%) | 0.21 \pm 0.01 | 0.21 \pm 0.01 | 0.22 \pm 0.01 | 0.24 \pm 0.01 | 0.26 \pm 0.01 | 0.24 \pm 0.01 |
| Anteiso 15:0 (%) | 0.35 \pm 0.01 | 0.35 \pm 0.01 | 0.37 \pm 0.01 | 0.41 \pm 0.01 | 1.24 \pm 0.04 | 1.17 \pm 0.03 |
| Iso 16:0 (%) | 0.24 \pm 0.01 | 0.25 \pm 0.01 | 0.26 \pm 0.01 | 0.29 \pm 0.01 | 0.49 \pm 0.02 | 0.41 \pm 0.01 |
| Anteiso 16:0 (%) | 0.09 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.01 | 0.10 \pm 0.01 | 0.01 \pm 0.01 | 0.29 \pm 0.01 |
| ΣBFA (%) | 0.89 \pm 0.02 | 0.89 \pm 0.02 | 0.93 \pm 0.02 | 0.91 \pm 0.03 | 2.28 \pm 0.08 | 2.12 \pm 0.05 |
| 14:1w5 (%) | 0.05 \pm 0.04 | 0.08 \pm 0.04 | 0.08 \pm 0.04 | 0.08 \pm 0.04 | 0.09 \pm 0.04 | 0.03 \pm 0.03 |
| 16:1w7 (%) | 8.15 \pm 0.40 | 7.84 \pm 0.16 | 8.42 \pm 0.34 | 8.21 \pm 0.22 | 8.21 \pm 0.14 | 8.21 \pm 0.14 |
| 16:1w5 (%) | 0.05 \pm 0.01 | 0.05 \pm 0.01 | 0.05 \pm 0.01 | 0.06 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.01 | 0.23 \pm 0.01 |
| 17:1w8 (%) | 0.46 \pm 0.02 | 0.47 \pm 0.02 | 0.49 \pm 0.02 | 0.49 \pm 0.02 | 0.52 \pm 0.02 | 0.39 \pm 0.03 |
| 18:1w13 (%) | 0.58 \pm 0.01 | 0.59 \pm 0.01 | 0.61 \pm 0.01 | 0.69 \pm 0.02 | 1.04 \pm 0.04 | 0.89 \pm 0.02 |
| 18:1w9 (%) | 11.72 \pm 0.47 | 11.75 \pm 0.26 | 11.46 \pm 0.42 | 10.02 \pm 0.74 | 8.60 \pm 0.59 | 9.17 \pm 0.46 |
| 18:1w7 (%) | 5.62 \pm 0.13 | 5.56 \pm 0.12 | 5.59 \pm 0.06 | 5.77 \pm 0.08 | 6.12 \pm 0.13 | 5.82 \pm 0.07 |
| 20:1w15 (%) | 0.09 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.01 | 0.16 \pm 0.02 | 0.37 \pm 0.03 |
| 20:1w14 (%) | 0.30 \pm 0.01 | 0.30 \pm 0.01 | 0.31 \pm 0.02 | 0.36 \pm 0.01 | 0.83 \pm 0.03 | 0.70 \pm 0.02 |
| 20:1w9 (%) | 0.71 \pm 0.10 | 0.69 \pm 0.08 | 0.69 \pm 0.07 | 0.81 \pm 0.11 | 1.01 \pm 0.15 | 1.27 \pm 0.09 |
| 22:1w9 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 23:1w9 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 24:1w9 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| ΣMUFA (%) | 27.74 \pm 0.77 | 27.42 \pm 0.41 | 27.79 \pm 0.50 | 26.60 \pm 0.68 | 26.80 \pm 0.42 | 26.49 \pm 0.28 |
| 18:2w6 (%) | 1.84 \pm 0.06 | 1.84 \pm 0.05 | 1.77 \pm 0.07 | 1.58 \pm 0.09 | 1.24 \pm 0.08 | 1.06 \pm 0.08 |
| 18:3w6 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 18:3w3 (%) | 0.89 \pm 0.07 | 0.90 \pm 0.06 | 0.86 \pm 0.04 | 0.77 \pm 0.06 | 0.67 \pm 0.05 | 0.71 \pm 0.03 |
| 20:3w6 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 20:4w6 (%) | 1.73 \pm 0.15 | 1.67 \pm 0.04 | 1.71 \pm 0.13 | 1.81 \pm 0.05 | 1.80 \pm 0.05 | 1.77 \pm 0.04 |
| 20:2w9,15 (%) | 0.09 \pm 0.01 | 0.10 \pm 0.02 | 0.10 \pm 0.01 | 0.10 \pm 0.02 | 0.26 \pm 0.01 | 0.34 \pm 0.01 |
| 20:2w6,15 (%) | 0.07 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.03 | 0.07 \pm 0.02 | 0.08 \pm 0.01 | 0.20 \pm 0.03 | 0.14 \pm 0.01 |
| 20:2w6 (%) | 0.30 \pm 0.05 | 0.30 \pm 0.04 | 0.3 \pm 0.03 | 0.33 \pm 0.03 | 0.31 \pm 0.03 | 0.41 \pm 0.04 |
| 20:3w3 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 20:4w3 (%) | 0.11 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.01 | 0.12 \pm 0.01 | 0.13 \pm 0.03 | 0.12 \pm 0.03 | 0.22 \pm 0.01 |
| 20:5w3 (%) | 21.43 \pm 0.62 | 21.59 \pm 0.44 | 21.31 \pm 0.18 | 22.49 \pm 0.51 | 23.48 \pm 0.45 | 24.49 \pm 0.47 |
| 22:2w6 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 22:5w3 (%) | 0.65 \pm 0.01 | 0.50 \pm 0.01 | 0.68 \pm 0.01 | 0.76 \pm 0.02 | 0.91 \pm 0.03 | 0.82 \pm 0.02 |
| 22:6w3 (%) | 16.02 \pm 0.54 | 16.21 \pm 0.39 | 16.87 \pm 0.18 | 17.10 \pm 0.41 | 16.17 \pm 0.35 | 18.21 \pm 0.47 |
| ΣPUFA (%) | 43.13 \pm 0.87 | 43.43 \pm 0.82 | 43.8 \pm 0.29 | 45.16 \pm 0.89 | 45.19 \pm 0.75 | 48.10 \pm 0.92 |

Tabla 2.2. Variaciones en la proporción (% del total de ácido grasos) de los ácidos grasos individuales y de los sumatorios por grupos de ácidos grasos saturados (SFA), ramificados (BFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) a lo largo del desarrollo gonadal del primer y segundo periodo de desoves de *M. brachydactyla* en las dos zonas de estudio (ría de Arousa y ría de A Coruña). En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar.

| Parámetros | Arousa | | | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | 1º Periodo de desove | | | 2º Periodo de desove | | |
| | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado II | Estado III | Estado IV |
| 12:0 (%) | 0.28 \pm 0.05 | 0.23 \pm 0.03 | 0.27 \pm 0.03 | 0.28 \pm 0.06 | 0.23 \pm 0.04 | 0.26 \pm 0.03 |
| 13:0 (%) | 0.08 \pm 0.03 | 0.08 \pm 0.03 | 0.07 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.02 | 0.10 \pm 0.03 | 0.07 \pm 0.02 |
| 14:0 (%) | 2.97 \pm 0.37 | 3.20 \pm 0.23 | 4.44 \pm 0.37 | 2.42 \pm 0.37 | 2.79 \pm 0.35 | 2.98 \pm 0.35 |
| 15:0 (%) | 0.86 \pm 0.20 | 1.13 \pm 0.06 | 1.16 \pm 0.10 | 0.60 \pm 0.12 | 0.98 \pm 0.08 | 1.04 \pm 0.05 |
| 16:0 (%) | 17.99 \pm 0.87 | 17.62 \pm 0.53 | 17.99 \pm 0.36 | 15.38 \pm 1.07 | 15.32 \pm 0.36 | 15.79 \pm 0.32 |
| 18:0 (%) | 4.21 \pm 0.59 | 4.34 \pm 0.35 | 5.18 \pm 0.38 | 4.05 \pm 0.81 | 3.90 \pm 0.21 | 4.76 \pm 0.33 |
| 20:0 (%) | 0.10 \pm 0.03 | 0.13 \pm 0.02 | 0.17 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.02 | 0.18 \pm 0.01 | 0.18 \pm 0.01 |
| 21:0 (%) | 0.09 \pm 0.02 | 0.10 \pm 0.02 | 0.10 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.03 | 0.12 \pm 0.02 | 0.10 \pm 0.02 |
| 22:0 (%) | 0.11 \pm 0.01 | 0.08 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.01 | 0.05 \pm 0.01 | 0.08 \pm 0.01 | 0.12 \pm 0.02 |
| 23:0 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 24:0 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| ΣSFA (%) | 26.68 \pm 1.23 | 26.89 \pm 0.59 | 29.49 \pm 0.79 | 23.92 \pm 1.17 | 24.96 \pm 0.43 | 27.23 \pm 0.77 |
| Iso 15:0 (%) | 0.27 \pm 0.16 | 0.38 \pm 0.11 | 0.30 \pm 0.06 | 0.21 \pm 0.09 | 0.32 \pm 0.08 | 0.24 \pm 0.03 |
| Anteiso 15:0 (%) | 0.90 \pm 0.33 | 0.63 \pm 0.15 | 0.51 \pm 0.11 | 0.71 \pm 0.26 | 0.64 \pm 0.27 | 0.49 \pm 0.14 |
| Iso 16:0 (%) | 0.61 \pm 0.20 | 0.82 \pm 0.10 | 0.58 \pm 0.12 | 0.67 \pm 0.05 | 0.86 \pm 0.06 | 0.61 \pm 0.03 |
| Anteiso 16:0 (%) | 0.37 \pm 0.09 | 0.45 \pm 0.05 | 0.39 \pm 0.05 | 0.28 \pm 0.15 | 0.40 \pm 0.07 | 0.41 \pm 0.04 |
| ΣBFA (%) | 2.15 \pm 0.63 | 2.27 \pm 0.28 | 1.78 \pm 0.26 | 1.50 \pm 0.59 | 1.92 \pm 0.36 | 1.61 \pm 0.16 |
| 14:1w5 (%) | 0.08 \pm 0.01 | 0.10 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.01 | 0.13 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.01 | 0.12 \pm 0.01 |
| 16:1w7 (%) | 7.36 \pm 1.18 | 8.58 \pm 0.29 | 9.94 \pm 0.29 | 5.64 \pm 0.80 | 7.16 \pm 0.37 | 7.44 \pm 0.19 |
| 16:1w5 (%) | 0.12 \pm 0.08 | 0.20 \pm 0.03 | 0.18 \pm 0.05 | 0.15 \pm 0.10 | 0.22 \pm 0.05 | 0.27 \pm 0.06 |
| 17:1w8 (%) | 0.51 \pm 0.10 | 0.57 \pm 0.04 | 0.55 \pm 0.04 | 0.35 \pm 0.08 | 0.47 \pm 0.06 | 0.43 \pm 0.04 |
| 18:1w13 (%) | 0.40 \pm 0.14 | 0.57 \pm 0.25 | 0.54 \pm 0.12 | 1.05 \pm 1.49 | 1.25 \pm 1.36 | 0.67 \pm 0.07 |
| 18:1w9 (%) | 11.21 \pm 0.42 | 10.52 \pm 0.15 | 11.42 \pm 0.24 | 13.08 \pm 1.08 | 12.09 \pm 0.48 | 12.93 \pm 0.24 |
| 18:1w7 (%) | 3.94 \pm 0.48 | 4.92 \pm 0.29 | 5.26 \pm 0.14 | 3.98 \pm 0.49 | 5.94 \pm 0.19 | 5.96 \pm 0.14 |
| 20:1w15 (%) | 0.16 \pm 0.07 | 0.13 \pm 0.06 | 0.29 \pm 0.10 | 0.17 \pm 0.15 | 0.18 \pm 0.12 | 0.46 \pm 0.15 |
| 20:1w14 (%) | 0.57 \pm 0.18 | 0.89 \pm 0.10 | 0.81 \pm 0.14 | 0.51 \pm 0.31 | 0.88 \pm 0.21 | 0.75 \pm 0.04 |
| 20:1w9 (%) | 0.42 \pm 0.12 | 0.63 \pm 0.05 | 0.59 \pm 0.03 | 0.61 \pm 0.16 | 0.66 \pm 0.03 | 0.82 \pm 0.09 |
| 22:1w9 (%) | 0.08 \pm 0.02 | 0.10 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.02 | 0.09 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.01 |
| 23:1w9 (%) | 0.08 \pm 0.04 | 0.11 \pm 0.03 | 0.09 \pm 0.03 | 0.21 \pm 0.17 | 0.13 \pm 0.07 | 0.15 \pm 0.04 |
| 24:1w9 (%) | 0.10 \pm 0.03 | 0.12 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.01 | 0.08 \pm 0.03 | 0.13 \pm 0.02 | 0.12 \pm 0.01 |
| ΣMUFA (%) | 25.04 \pm 0.90 | 27.44 \pm 0.58 | 30.00 \pm 0.53 | 26.07 \pm 1.78 | 29.36 \pm 1.08 | 30.24 \pm 0.45 |
| 18:2w6 (%) | 1.09 \pm 0.12 | 1.05 \pm 0.11 | 1.02 \pm 0.08 | 0.96 \pm 0.10 | 1.05 \pm 0.06 | 1.01 \pm 0.10 |
| 18:3w6 (%) | 1.30 \pm 0.16 | 0.68 \pm 0.04 | 0.49 \pm 0.04 | 1.08 \pm 0.23 | 0.57 \pm 0.06 | 0.42 \pm 0.02 |
| 18:3w3 (%) | 0.25 \pm 0.03 | 0.21 \pm 0.02 | 0.22 \pm 0.02 | 0.28 \pm 0.05 | 0.21 \pm 0.02 | 0.23 \pm 0.02 |
| 20:3w6 (%) | 0.05 \pm 0.02 | 0.06 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.02 | 0.07 \pm 0.02 | 0.07 \pm 0.02 | 0.08 \pm 0.01 |
| 20:4w6 (%) | 3.51 \pm 0.20 | 2.74 \pm 0.10 | 2.41 \pm 0.07 | 4.53 \pm 0.28 | 3.60 \pm 0.13 | 3.30 \pm 0.08 |
| 20:2w9,15 (%) | 0.32 \pm 0.10 | 0.28 \pm 0.17 | 0.79 \pm 0.23 | 0.26 \pm 0.23 | 0.45 \pm 0.21 | 0.43 \pm 0.25 |
| 20:2w6,15 (%) | 0.11 \pm 0.05 | 0.18 \pm 0.05 | 0.24 \pm 0.08 | 0.12 \pm 0.11 | 0.15 \pm 0.08 | 0.24 \pm 0.04 |
| 20:2w6 (%) | 0.41 \pm 0.04 | 0.36 \pm 0.02 | 0.42 \pm 0.02 | 0.39 \pm 0.07 | 0.37 \pm 0.02 | 0.43 \pm 0.02 |
| 20:3w3 (%) | 0.09 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.01 | 0.14 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.01 | 0.15 \pm 0.01 |
| 20:4w3 (%) | 0.11 \pm 0.06 | 0.07 \pm 0.02 | 0.08 \pm 0.04 | 0.12 \pm 0.11 | 0.15 \pm 0.09 | 0.21 \pm 0.10 |
| 20:5w3 (%) | 20.99 \pm 1.51 | 20.30 \pm 0.39 | 18.59 \pm 1.18 | 22.10 \pm 0.84 | 20.06 \pm 0.67 | 18.41 \pm 1.04 |
| 22:2w6 (%) | 0.06 \pm 0.03 | 0.07 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.03 | 0.07 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.01 |
| 22:5w3 (%) | 0.80 \pm 0.23 | 0.65 \pm 0.29 | 0.47 \pm 0.13 | 0.42 \pm 0.15 | 0.49 \pm 0.19 | 0.54 \pm 0.10 |
| 22:6w3 (%) | 17.03 \pm 0.64 | 16.62 \pm 0.50 | 13.73 \pm 0.37 | 17.96 \pm 0.68 | 16.38 \pm 0.66 | 15.40 \pm 0.48 |
| ΣPUFA (%) | 46.12 \pm 1.71 | 43.40 \pm 0.83 | 38.73 \pm 0.90 | 48.51 \pm 1.61 | 43.76 \pm 0.95 | 40.93 \pm 0.97 |

Tabla 2.2. Variaciones en la proporción (% del total de ácidos grasos) de los ácidos grasos individuales y de los sumatorios por grupos de ácidos grasos saturados (SFA), ramificados (BFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) a lo largo del desarrollo gonadal del primer y segundo periodo de desoves de *M. brachydactyla* en las dos zonas de estudio (ría de Arousa y ría de A Coruña). En cada variable se representan los valores de la media \pm desviación estándar (continuación).

| Parámetros | A Coruña | | | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | 1º Periodo de desove | | | 2º Periodo de desove | | |
| | Estado II | Estado III | Estado IV | Estado II | Estado III | Estado IV |
| 12:0 (%) | 0.26 \pm 0.04 | 0.23 \pm 0.04 | 0.21 \pm 0.04 | 0.14 \pm 0.07 | 0.15 \pm 0.05 | 0.17 \pm 0.03 |
| 13:0 (%) | 0.04 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.02 |
| 14:0 (%) | 2.85 \pm 0.42 | 3.81 \pm 0.32 | 4.75 \pm 0.32 | 2.33 \pm 0.23 | 2.97 \pm 0.28 | 3.23 \pm 0.33 |
| 15:0 (%) | 0.86 \pm 0.19 | 1.21 \pm 0.08 | 1.23 \pm 0.06 | 0.61 \pm 0.09 | 1.05 \pm 0.09 | 1.05 \pm 0.09 |
| 16:0 (%) | 16.07 \pm 0.34 | 16.74 \pm 0.23 | 17.42 \pm 0.35 | 14.56 \pm 0.29 | 14.53 \pm 0.26 | 14.5 \pm 0.22 |
| 18:0 (%) | 4.30 \pm 0.37 | 4.30 \pm 0.29 | 4.67 \pm 0.4 | 4.08 \pm 0.5 | 4.14 \pm 0.66 | 4.18 \pm 0.26 |
| 20:0 (%) | 0.08 \pm 0.01 | 0.14 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.02 | 0.07 \pm 0.02 | 0.09 \pm 0.03 | 0.10 \pm 0.01 |
| 21:0 (%) | 0.04 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.01 | 0.08 \pm 0.02 | 0.03 \pm 0.01 | 0.06 \pm 0.02 | 0.10 \pm 0.02 |
| 22:0 (%) | 0.13 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.01 | 0.10 \pm 0.05 | 0.10 \pm 0.03 | 0.11 \pm 0.02 |
| 23:0 (%) | 0.01 \pm 0.01 | 0.02 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.07 | 0.02 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.02 | 0.03 \pm 0.01 |
| 24:0 (%) | 0.02 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.01 | 0.02 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.01 | 0.01 \pm 0.01 | 0.01 \pm 0.01 |
| ΣSFA (%) | 23.86 \pm 0.55 | 25.36 \pm 0.31 | 26.73 \pm 0.55 | 22.02 \pm 0.57 | 23.18 \pm 0.68 | 23.50 \pm 0.36 |
| Iso 15:0 (%) | 0.22 \pm 0.02 | 0.37 \pm 0.02 | 0.33 \pm 0.02 | 0.23 \pm 0.02 | 0.34 \pm 0.02 | 0.26 \pm 0.02 |
| Anteiso 15:0 (%) | 0.93 \pm 0.08 | 0.65 \pm 0.04 | 0.53 \pm 0.03 | 0.75 \pm 0.06 | 0.60 \pm 0.04 | 0.47 \pm 0.03 |
| Iso 16:0 (%) | 0.30 \pm 0.22 | 0.58 \pm 0.14 | 0.46 \pm 0.07 | 0.23 \pm 0.02 | 0.62 \pm 0.04 | 0.47 \pm 0.03 |
| Anteiso 16:0 (%) | 0.38 \pm 0.03 | 0.47 \pm 0.03 | 0.42 \pm 0.02 | 0.24 \pm 0.02 | 0.43 \pm 0.03 | 0.44 \pm 0.03 |
| ΣBFA (%) | 2.30 \pm 0.18 | 2.35 \pm 0.16 | 1.88 \pm 0.11 | 1.45 \pm 0.11 | 2.00 \pm 0.13 | 1.64 \pm 0.10 |
| 14:1w5 (%) | 0.11 \pm 0.02 | 0.10 \pm 0.05 | 0.09 \pm 0.05 | 0.03 \pm 0.03 | 0.06 \pm 0.04 | 0.09 \pm 0.05 |
| 16:1w7 (%) | 6.18 \pm 0.55 | 8.03 \pm 0.14 | 8.10 \pm 0.20 | 4.94 \pm 0.96 | 5.85 \pm 0.42 | 6.98 \pm 0.31 |
| 16:1w5 (%) | 0.10 \pm 0.01 | 0.21 \pm 0.01 | 0.18 \pm 0.01 | 0.17 \pm 0.01 | 0.24 \pm 0.02 | 0.29 \pm 0.02 |
| 17:1w8 (%) | 0.31 \pm 0.03 | 0.31 \pm 0.03 | 0.31 \pm 0.04 | 0.25 \pm 0.05 | 0.28 \pm 0.05 | 0.27 \pm 0.03 |
| 18:1w13 (%) | 0.37 \pm 0.03 | 0.52 \pm 0.03 | 0.57 \pm 0.03 | 0.60 \pm 0.05 | 0.69 \pm 0.04 | 0.71 \pm 0.04 |
| 18:1w9 (%) | 11.20 \pm 0.22 | 10.03 \pm 0.44 | 12.01 \pm 0.26 | 11.43 \pm 0.25 | 11.23 \pm 0.20 | 13.03 \pm 0.23 |
| 18:1w7 (%) | 3.51 \pm 0.37 | 4.63 \pm 0.17 | 5.20 \pm 0.08 | 4.41 \pm 0.17 | 5.25 \pm 0.13 | 5.75 \pm 0.09 |
| 20:1w15 (%) | 0.19 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.01 | 0.33 \pm 0.02 | 0.21 \pm 0.02 | 0.26 \pm 0.02 | 0.51 \pm 0.03 |
| 20:1w14 (%) | 0.54 \pm 0.04 | 0.90 \pm 0.06 | 0.82 \pm 0.06 | 0.46 \pm 0.04 | 0.89 \pm 0.07 | 0.84 \pm 0.11 |
| 20:1w9 (%) | 0.76 \pm 0.05 | 0.77 \pm 0.10 | 0.72 \pm 0.08 | 0.76 \pm 0.05 | 0.99 \pm 0.10 | 0.95 \pm 0.06 |
| 22:1w9 (%) | 0.26 \pm 0.03 | 0.20 \pm 0.03 | 0.18 \pm 0.02 | 0.12 \pm 0.05 | 0.15 \pm 0.03 | 0.18 \pm 0.02 |
| 23:1w9 (%) | 0.10 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.01 | 0.10 \pm 0.01 | 0.34 \pm 0.03 | 0.17 \pm 0.01 | 0.16 \pm 0.01 |
| 24:1w9 (%) | 0.01 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.01 | 0.12 \pm 0.03 | 0.09 \pm 0.04 | 0.09 \pm 0.02 |
| ΣMUFA (%) | 23.63 \pm 0.76 | 25.94 \pm 0.54 | 28.6 \pm 0.45 | 23.85 \pm 1.16 | 26.15 \pm 0.61 | 29.86 \pm 0.46 |
| 18:2w6 (%) | 1.04 \pm 0.14 | 1.09 \pm 0.20 | 1.13 \pm 0.11 | 1.29 \pm 0.16 | 1.18 \pm 0.05 | 1.15 \pm 0.12 |
| 18:3w6 (%) | 1.25 \pm 0.09 | 0.72 \pm 0.07 | 0.60 \pm 0.04 | 1.45 \pm 0.16 | 0.74 \pm 0.07 | 0.53 \pm 0.02 |
| 18:3w3 (%) | 0.18 \pm 0.02 | 0.18 \pm 0.02 | 0.16 \pm 0.02 | 0.09 \pm 0.03 | 0.16 \pm 0.02 | 0.15 \pm 0.02 |
| 20:3w6 (%) | 0.04 \pm 0.03 | 0.08 \pm 0.02 | 0.09 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.03 | 0.10 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.01 |
| 20:4w6 (%) | 2.99 \pm 0.10 | 3.08 \pm 0.07 | 2.73 \pm 0.09 | 4.04 \pm 0.26 | 3.81 \pm 0.16 | 3.48 \pm 0.04 |
| 20:2w9,15 (%) | 0.33 \pm 0.03 | 0.23 \pm 0.02 | 0.89 \pm 0.05 | 0.26 \pm 0.02 | 0.48 \pm 0.03 | 0.38 \pm 0.02 |
| 20:2w6,15 (%) | 0.13 \pm 0.01 | 0.19 \pm 0.01 | 0.28 \pm 0.02 | 0.19 \pm 0.01 | 0.19 \pm 0.01 | 0.26 \pm 0.02 |
| 20:2w6 (%) | 0.31 \pm 0.02 | 0.28 \pm 0.02 | 0.33 \pm 0.01 | 0.29 \pm 0.02 | 0.30 \pm 0.02 | 0.34 \pm 0.02 |
| 20:3w3 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 20:4w3 (%) | 0.10 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.01 | 0.18 \pm 0.01 | 0.19 \pm 0.01 | 0.20 \pm 0.01 |
| 20:5w3 (%) | 24.66 \pm 0.81 | 22.43 \pm 0.56 | 21.27 \pm 0.78 | 26.25 \pm 1.84 | 23.69 \pm 0.43 | 21.77 \pm 0.82 |
| 22:2w6 (%) | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 22:5w3 (%) | 0.76 \pm 0.06 | 0.61 \pm 0.04 | 0.47 \pm 0.03 | 0.45 \pm 0.03 | 0.57 \pm 0.04 | 0.55 \pm 0.03 |
| 22:6w3 (%) | 18.42 \pm 0.49 | 17.39 \pm 0.48 | 14.77 \pm 0.54 | 18.14 \pm 0.89 | 17.26 \pm 0.48 | 16.09 \pm 0.48 |
| ΣPUFA (%) | 50.21 \pm 0.79 | 46.36 \pm 0.54 | 42.79 \pm 0.52 | 52.68 \pm 1.21 | 48.67 \pm 0.43 | 45.00 \pm 0.67 |

